

APPEL D'OFFRES 2011
« Recherche et Greffe »
PROJETS FINANCES ET RESULTATS

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
ANGLICHEAU Dany	<u>Rôle de miR-146a dans la réponse épithéliale tubulaire rénale à l'inflammation</u>	3
BRIOT Raphaël	<u>Intérêt du monoxyde de carbone comme marqueur des lésions d'ischémie-reperfusion de poumons reconditionnés ex vivo</u>	2
CANQUE Bruno	<u>Optimisation de la recolonisation thymique après greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines</u>	3
COHEN José	<u>Etude de l'effet bystander des lymphocytes T régulateurs : mécanismes d'action et application thérapeutique</u>	3
GAGNE Katia	<u>Etude rétrospective et multicentrique de l'alloréactivité des cellules NK dans la prise de greffe de double sang de cordon</u>	3
GAIN Philippe	<u>Nouvelle technologie de conservation cornéenne en Bioréacteur</u>	2
GAUGLER Béatrice	<u>Rôle de l'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte</u>	3
HANNOUCHE Didier	<u>Développement et validation d'un modèle animal pour l'étude de l'intégration et de la ligamentisation d'une greffe de ligament croisé antérieur</u>	2
ISNARD Richard	<u>Administration de cellules souches mésenchymateuses dans le traitement de la maladie du greffon chez le transplanté cardiaque – Suivi immunologique</u>	3
KALFA David	<u>Reconstruction de la voie de sortie du ventricule droit par un tube valve biorésorbable cellularisé autologue</u>	6
MAISON Patrick	<u>Evaluation du processus d'information dans le cadre de greffe intracérébrale de cellules embryonnaires</u>	1
MOREAU-GAUDRY François	<u>Thérapie de la porphyrie érythropoïétique congénitale à l'aide des cellules souches pluripotentes induites</u>	6
MOUGIN Christiane	<u>Evaluation du statut viral HPV chez des patients avant et après transplantation rénale à l'ère de la vaccination contre les HPV</u>	7
PATTOU François	<u>Evaluation chez le mini-porc de la survie et de la sécrétion des îlots de Langerhans greffés dans le muscle lors d'une CO-TX avec des progéniteurs endothéliaux circulants (PECS)</u>	6

RONDEAU Eric	Nouveaux biomarqueurs non invasifs de néphrotoxicité de la ciclosporine : approche transcriptomique appliquée à la clinique	4
SANTELMO Nicolas	Préservation et évaluation pulmonaire in situ par perfusion froide percutanée dans le cadre du prélèvement d'organes à cœur arrêté : Évaluation de la faisabilité chez le porc	2
STERKERS Ghislaine	Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pédiatrique	3

THEMES DE RECHERCHE

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales : études dans le domaine de la santé publique et / ou de l'éthique
- 2) Amélioration du prélèvement 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
- 7) Prévention des risques sanitaires dans les domaines du prélèvement et de la greffe

Rôle de miR-146a dans la réponse épithéliale tubulaire rénale à l'inflammation

Dany ANGLICHEAU (Hôpital Necker, Paris)

Les cellules épithéliales rénales subissent des modifications phénotypiques intenses en réponse à l'agression inflammatoire au cours du rejet aigu (expression de cytokines/chimiokines/molécules de surface). Les mécanismes moléculaires de ces altérations sont mal connus. Une percée importante de la biologie de la dernière décennie est la découverte des microARN (miARN) qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Les miARN émergent actuellement comme des régulateurs clé de la réponse immune innée et adaptative (Anglicheau, *Transplantation* 2010). Nous avons précédemment rapporté la première étude décrivant leur expression dans le greffon rénal au cours du rejet aigu, et avons montré que le rejet aigu altère profondément le profil d'expression des miARN (Anglicheau, *PNAS* 2009). Pour identifier les conséquences de l'inflammation sur l'expression des miARN, nous avons étudié le profil d'expression global des miARN dans des cellules tubulaires rénales exposées à des cytokines proinflammatoires et nous avons trouvé que, parmi 768 miARN, un nombre limité de miARN était significativement régulé par l'inflammation. En particulier, miR-146a était le miARN le plus induit par l'inflammation. L'objectif de ce projet est d'identifier le rôle de miR-146a *in vitro* et *in vivo* dans les cellules tubulaires rénales subissant une agression inflammatoire. Nos objectifs spécifiques sont : (#1) d'identifier les conséquences fonctionnelles de l'induction de miR-146a dans les cellules épithéliales rénales; (#2) d'étudier l'impact de cytokines pro-inflammatoires et de ligands de TLR sur l'expression de miR-146a; (#3) d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'induction de miR-146a induite par l'inflammation; (#4) de valider *in vivo* l'induction de miR-146a induite par l'inflammation en développant un modèle *in vivo* de néphrite interstitielle aiguë.

La lignée de cellules tubulaires proximales humaines HK2 et des cultures primaires épithéliales rénales seront utilisées pour les expériences *in vitro*. Le stimulus Inflammatoire sera induit par le traitement avec du surnageant de culture de PBMC activées par la PHA ou par l'IFN γ , le TNF α , l'IL1 β , l'IL6 et l'IL17. L'expression des miARN et des ARNm sera évaluée par PCRq. Des analyses transcriptomiques seront réalisées sur des cellules transfectées avec un inhibiteur ou un précurseur de miR-146a pour identifier les ARNm cibles de miR-146a. Des algorithmes de prédiction seront utilisés pour identifier les ARNm candidats. La sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales rénales sera quantifiée par Luminex. Un modèle animal de néphrite interstitielle aiguë sera développé.

Ce projet devrait permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes régulant la réponse de l'épithélium tubulaire à l'inflammation qui caractérise non seulement l'agression allo-immune subie par le greffon rénal, mais aussi l'inflammation locale subie par les reins natifs au cours de nombreuses néphropathies.

Publication :

Amrouche L, Desbuissons G, Rabant M, Sauvaget V, Nguyen C, Benon A, et al. MicroRNA-146a in Human and Experimental Ischemic AKI: CXCL8-Dependent Mechanism of Action. *JASN*. 2 janv 2017;28(2):479-93.

Intérêt du monoxyde de carbone comme marqueur des lésions d'ischémie-reperfusion de poumons reconditionnés ex vivo

Raphaël BRIOT (CHU Grenoble)

Objectifs

La pénurie d'organes en transplantation pulmonaire et le nombre croissant de patients inscrits en liste d'attente ont amené certaines équipes à envisager la transplantation de poumons initialement récusés (poumons dits « marginaux »). Néanmoins, cette nouvelle technique n'est possible qu'après évaluation de la viabilité des greffons. Par ailleurs, l'évaluation des lésions notamment d'ischémie reperfusion doit d'être non invasive afin de ne pas détériorer les organes.

Le monoxyde de carbone (CO) est produit dans l'organisme par l'hème oxygénase (HO). Il possède une activité anti-inflammatoire et anti-apoptotique. Son administration diminue les lésions inflammatoires en situation d'ischémie-reperfusion et ce notamment dans des modèles de transplantation pulmonaire. De plus, la mesure du CO expiré est validée en tant que marqueur non invasif de lésions inflammatoires pulmonaires. Notre objectif est d'étudier l'intérêt du CO expiré comme marqueur non invasif des lésions d'ischémie-reperfusion lors du reconditionnement de poumons *ex-vivo*.

Résultats attendus

Nous pensons mettre en évidence une relation inverse entre la concentration en CO expiré et l'importance des lésions d'ischémie-reperfusion objectivées par des mesures invasives. La diminution du CO pourrait ainsi traduire une altération du système HO-1/CO. Nous souhaitons décrire des valeurs références de CO comme critère de viabilité de poumons marginaux.

Méthodologie

Modèle porcin. Des porcs de 20kg sont anesthésiés, leurs poumons sont prélevés et subissent une ischémie froide de durée variable. Les poumons sont ensuite reconditionnés par circulation extracorporelle, ventilation mécanique et réchauffement progressif. Après 45 minutes d'état stable à 32°C, les poumons sont évalués par des marqueurs invasifs (mesures de la perméabilité alvéolocapillaire, de la clairance liquidienne et du profil hémodynamique) et par la mesure non invasive du CO expiré.

Mesure du CO. Elle s'effectue par spectrométrie d'absorption laser avec utilisation d'une cavité résonnante de haute finesse. L'appareil possède un seuil de détection du CO inférieur à 5 parties par milliards (ppb) et une fréquence d'acquisition de quelques hertz (5-10Hz). Grâce à des techniques de pollution au CO et/ou en air pur ($[CO] < 20\text{ppb}$), nous avons validé la fiabilité de cette mesure dans un modèle de poumon isolé perfusé et ventilé.

Protocole. 4 groupes de porcs seront constitués: contrôle (ischémie de 30 minutes); ischémie prolongée (2 heures); contrôle + SnPP IX (un antagoniste de HO); ischémie prolongée + SnPP IX. Nous étudierons la corrélation entre CO et marqueurs invasifs d'une part, et mesure de cytokines pro / anti inflammatoires d'autre part.

Poumons humains. A partir de poumons humains récusés, nous effectuerons des mesures de CO expiré afin de déterminer des valeurs références de viabilité chez l'homme. Les méthodes de reconditionnement et les mesures effectuées sont les mêmes que celles réalisées sur le modèle porcin.

Publications :

Maignan M, Briot R, Romanini D, Gennai S, Hazane-Puch F, Brouta A, et al. Real-time measurements of endogenous carbon monoxide production in isolated pig lungs. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(4):047001–047001.

Maignan M, Gennai S, Debaty G, Romanini D, Schmidt M-H, Brenckmann V, et al. Exhaled carbon monoxide is correlated with ischemia reperfusion injuries during ex vivo lung perfusion in pigs. *J Breath Res*. 21 août 2017;11(3):036004.

Optimisation de la recolonisation thymique après greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines

Bruno CANQUE (INSERM)

Objectifs : le programme de recherche proposé vise à optimiser la restauration de la thymopoïèse chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il a pour principal objectif de définir le rôle joué par les cellules colonisatrices du thymus, les préthymocytes, dans ce contexte.

Résultats attendus et méthodologie : Au cours de l'année écoulée nous avons implanté au laboratoire un modèle de xéno greffe chez la souris NSG de progéniteurs hématopoïétiques humains isolés de sang placentaire, ceci afin d'étudier des mécanismes contrôlant l'émergence et la dynamique des préthymocytes médullaires (*Haddad et col. Immunity 2006, 24:217*). Nous avons montré par ailleurs, à travers la caractérisation fonctionnelle de la protéine oncogénique AF1q, que la différenciation de ces cellules repose sur un contrôle subtil de la susceptibilité intrinsèque des progéniteurs hématopoïétiques multipotents à l'engagement des récepteurs de la famille Notch (*Parcelier et al, soumis*). Les résultats déjà obtenus démontrent la pertinence de l'utilisation du modèle murin NSG pour l'étude de la biologie des préthymocytes. On détecte en effet 4 semaines après la greffe une population abondante de préthymocytes dans la moelle osseuse des animaux reconstitués. Cette population est également retrouvée à l'état de traces dans la rate, ainsi que dans le thymus dont elle constitue le contingent cellulaire le plus immature. Le suivi cinétique des animaux révèle par ailleurs un déclin rapide de la population de préthymocytes médullaires corrélé à l'épuisement progressif de la thymopoïèse. Cette cinétique est tout à fait superposable à celle que nous avons décrite au sein de la moelle osseuse humaine. Les mécanismes responsables du déclin des préthymocytes restent encore mal connus. Il s'agira ici de définir les rôles joués respectivement par le vieillissement du compartiment des cellules souches hématopoïétiques et par le remodelage post-natal du micro-environnement médullaire dans leur disparition. Notre hypothèse de travail s'articule autour du contrôle moléculaire de la voie de signalisation Notch. Il s'agira notamment de relier le déclin des préthymocytes à un déficit fonctionnel de la voie Notch au sein des progéniteurs hématopoïétiques et/ou des cellules stromales. Nous testerons ensuite diverses stratégies visant à compenser le défaut de colonisation thymique lié à la raréfaction des préthymocytes médullaires.

Publication :

Parietti V, Nelson E, Telliem G, Le Noir S, Pla M, Delord M, et al. Dynamics of Human Prothymocytes and Xenogeneic Thymopoiesis in Hematopoietic Stem Cell-Engrafted Nonobese Diabetic-SCID/IL-2r null Mice. *The Journal of Immunology*. 15 août 2012;189(4):1648-60.

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

José COHEN (Hôpital Henri Mondor)

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

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

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

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

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

Publications :

1. Martin GH, Grégoire S, Landau DA, Pilon C, Grinberg-Bleyer Y, Charlotte F, et al. In vivo activation of transferred regulatory T cells specific for third-party exogenous antigen controls GVH disease in mice: Immunomodulation. *European Journal of Immunology*. sept 2013;43(9):2263-72.
2. Pérol L, Martin GH, Maury S, Cohen JL, Piaggio E. Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunology Letters*. déc 2014;162(2):173-84.

Etude rétrospective et multicentrique de l'alloréactivité des cellules NK dans la prise de greffe de double sang de cordon

Katia GAGNE (EFS Pays de la Loire)

La greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) d'origine placentaire (greffe de sang de cordon) est une alternative à la greffe de CSH d'origine médullaire (MO) ou périphérique (CSP) pour les patients atteints de pathologies malignes en l'absence d'un donneur HLA 10/10 identique. Le choix d'une unité de sang de cordon repose en particulier sur la quantité de cellules CD34+ et le niveau de compatibilité des gènes HLA-A, -B et -DRB1, ces 2 facteurs étant associés à la prise du greffon. L'immaturation des cellules immunitaires des unités de sang de cordon permet d'accepter certaines incompatibilités HLA de classe I entre le greffon et le patient. Etant donné que ces incompatibilités cordon/patient sont principalement ciblées au niveau des molécules HLA-Cw, principaux ligands des KIR, nous émettons l'hypothèse que les réponses NK KIR alloréactives pourraient jouer un rôle sur la prise de greffe de sang de cordon. Par ailleurs, chez les patients adultes, afin d'augmenter la quantité de cellules CD34+ injectées et d'améliorer la probabilité de prise de greffe, l'utilisation de 2 unités de sang de cordon a été développée et dans la plupart des greffes, seul l'un des 2 cordons contribue à l'hématopoïèse du patient. Les explications cliniques et/ou immunologiques de la prise d'un des deux greffons restent énigmatiques. Dans ce contexte de « ménage à 3 », impliquant des réponses lymphocytaires T et NK alloréactives non seulement entre chaque cordon et le patient mais aussi entre les 2 cordons, l'alloréactivité T et/ou NK pourrait jouer un rôle dans la prise d'un seul cordon. A l'heure actuelle, aucune étude portant sur l'impact combiné des disparités des gènes KIR et des KIR ligands sur la prise de greffes de sang de cordon n'a été publiée. En collaboration avec la SFGM-TC, RFGM et la SFHI, nous mènerons une étude génétique multicentrique et rétrospective de l'impact des incompatibilités des KIR ligand, des gènes KIR et des combinaisons KIR/KIR ligand sur la prise d'un seul cordon à partir de 150 double-greffes de sang de cordon.

Les données génotypiques (typages des gènes KIR et KIR ligand), biologiques et cliniques seront confrontées dans des analyses statistiques multivariées. En parallèle, nous étudierons le répertoire NK KIR au niveau phénotypique et fonctionnel par cytométrie de flux à partir de prélèvements placentaires issus de la maternité du CHU de Nantes afin de mieux appréhender l'alloréactivité des cellules NK KIR contribuant à la prise de greffe au niveau cellulaire. L'étude génétique doit nous permettre de dégager l'impact de certains KIR ou de combinaisons KIR/KIR ligand sur la prise de double-greffes de sang de cordon. En particulier, la prise en compte des génotypes KIR des cordons pourrait constituer un outil pronostic dans la prise du greffon.

Publication :

Rettman P, Legrand N, Willem C, Lodé L, Chevallier P, Cesbron A, et al. Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica*. 1 nov 2015;100(11):e475-9.

Nouvelle technologie de conservation cornéenne en Bioréacteur

Philippe GAIN (Université Jean Monnet, Saint-Etienne)

Objectifs

Développer et valider un bioréacteur (BR) recréant la pression intra oculaire normale pour (1) améliorer la viabilité du greffon cornéen par rapport à la technique classique d'organoculture (OC) et (2) permettre des développements technologiques : contrôle qualité optique et cellulaire du greffon, découpes cornéennes spéciales.

Background

L'OC qui est la référence actuelle en Europe, a peu évolué depuis sa mise au point dans les années 70. Elle reste « rustique » et nécessite de nombreuses manipulations : la cornée est placée à +31°C dans un flacon clos de milieu nutritif renouvelé après 14J. En salle blanche et sous hotte (pour limiter les contaminations), la cornée est sortie du milieu pour être préparée au comptage des cellules endothéliales (CE), critère principal de validation du greffon. Les CE responsables du maintien de la transparence du greffon sont dépourvues de capacité de régénération : tout doit donc être mis en œuvre pour les préserver au mieux. Cependant, durant l'OC, la perte de CE est importante : 1% par jour vs 0,6% par an chez le sujet vivant et la conservation limitée à 5 semaines. De plus, le greffon non soumis à la pression intraoculaire normale, s'œdématie. L'œdème engendre des plis endothéliaux responsables d'une surmortalité des CE. Les altérations endothéliales entretiennent à leur tour l'œdème. La greffe en l'état est impossible et une étape supplémentaire de 48H de déturgescence en milieu hyperosmolaire (Dextran) est indispensable avant greffe. Cette étape génère encore une surmortalité de CE. Enfin, à chaque déconditionnement, un contrôle microbiologique est nécessaire.

Retombées attendues

1/amélioration de la viabilité cellulaire de 15% (travaux préliminaires) : plus de greffons délivrés (réduction de l'attente des patients), greffons de meilleure qualité (survie de la greffe augmentée chez le patient), conservation prolongeable à très long terme (réserve de cornées toujours disponibles)

2/amélioration des contrôles qualité cellulaires et tissulaires (et introduction de nouveaux critères en adéquation avec les rôles futures des banques (pré-découpe cornéennes spéciales))

3/réalisation possible par les banques des pré-découpes cornéennes (greffes endothéliales)

4/libération immédiate du greffon (pas de déturgescence)

5/simplification du process : moindre perte de qualité tissulaire et moindre risque de contamination, donc plus de greffons et meilleure efficacité médico-économique de la banque

6/ simplification de l'infrastructure : acceptation facilitée de la méthode par les banques.

Méthodologie

- Pré-projet débuté en 2010 avec preuve de concept obtenue au laboratoire « Biologie, imagerie et ingénierie de la Greffe de Cornée » : cahier des charges et premier prototype réalisé. Brevet en cours avec notre partenaire (Ecole Nationale d'Ingénieur de St Etienne(ENISE)).
- **Projet 2011-2012 en 4 phases de 6 mois:**
- tests « physiques » du BR : validation de la stabilité de la pression par microcapteurs (sur 20 cornées)
- tests comparatifs BR versus OC sur 3x10 paires de cornées après conservation 14, 21 (durée habituelle en Europe) et 35 jours. Analyses biologiques (viabilité)/optiques (transparence/épaisseur)/microbiologiques
- tests comparatifs BR versus OC après conservation à très long terme : 3 mois (sur 30 paires)
- translation dans 2 banques EFS pilotes (St-Etienne et Besançon) : runs à blanc comparatifs avec conservation 21 jours : BR vs OC (sur 100 paires de cornées). + en parallèle :

développement sur le BR des contrôles innovants (optique du stroma, comptage endothélial 3D) et des découpes cornéennes (microkératome et femtoseconde), - Essai clinique en 2013 (PHRC multicentrique) avec greffes et suivis de patients.

Brevet :

Medical device intended for the long-term storage of a cornea, or for ex vivo experimentation on a human or animal cornea [Internet]. Disponible sur:
<http://www.google.com/patents/WO2014140434A1>

Rôle de l'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte

Béatrice GAUGLER (EFS Franche-Comté)

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-SCT) est utilisée pour le traitement des hémopathies malignes. Le bénéfice curatif de l'allo-SCT est dû à l'effet du greffon contre la leucémie (GVL), au cours duquel les cellules tumorales résiduelles sont reconnues et éliminées par des mécanismes immunologiques. Cependant, l'allo-SCT est limitée par les complications liées à la toxicité des procédures et à la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Des études précédentes ont démontré le rôle des lymphocytes TH1 dans la physiopathologie de la GVHD, ou plus récemment la contribution des sous-populations TH17 et Treg. L'interleukine-22 (IL-22) appartient à la famille de l'IL-10, et est produite par de nombreuses cellules, notamment les TH1, TH17 et cellules NK. Sa principale fonction décrite est de participer à l'immunité innée, en induisant la production de peptides antimicrobiens comme les b-défensines, par les cellules épithéliales. L'IL-22 peut exercer soit un rôle protecteur ou pathologique dans les maladies inflammatoires selon le tissu affecté ou le milieu environnant. Etant donné le large spectre d'activités de l'IL-22, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pouvait être impliquée dans le développement de la GVHD. C'est ce que nous voulons étudier dans un modèle expérimental murin de GVHD aiguë en utilisant des souris déficientes pour l'IL-22. Nos données préliminaires indiquent que la déficience en IL-22 des lymphocytes T allogéniques réduit significativement la mortalité et la sévérité de la GVHD, suggérant un rôle pathologique dans ce contexte expérimental. Nos objectifs visent à étudier l'influence de l'IL-22 dans la GVHD et l'effet GVL et de comprendre les mécanismes associés. Nous proposons dans ce projet i) d'évaluer si l'effet GVL est préservé en l'absence de production d'IL-22 par les lymphocytes T, ii) d'identifier les mécanismes impliqués dans les effets délétères de l'IL-22 : pour cela, nous caractériserons l'expression des défensines et cathélicidines dans les tissus cibles de la GVHD, nous déterminerons également la régulation des sous-populations lymphocytaires TH1, TH17, TH22 et Treg dans le modèle et iii) nous évaluerons le rôle de l'IL-22 en caractérisant les cellules T infiltrantes et l'expression des défensines et cathélicidines des biopsies intestinales d'une cohorte de 20 patients atteints de GVHD. Cette étude permettra pour la première fois de caractériser le rôle de l'IL-22 dans la GVHD et la contribution des défensines dans cette maladie. Comme le nombre de patients traités par allo-SCT continue de croître avec les nouvelles procédures, une meilleure compréhension des facteurs de risque de GVHD, des mécanismes cellulaires et cytokines impliqués dans sa physiopathologie, ainsi que des stratégies de prévention et de traitement sont encore nécessaires. Les résultats escomptés de cette étude devraient déboucher sur de nouvelles perspectives de modulation de la GVHD en ciblant l'action de l'IL-22.

Publications :

1. Couturier M, Lamarthée B, Arbez J, Renauld J-C, Bossard C, Malard F, et al. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia*. juill 2013;27(7):1527-37.
2. Gaugler B, Lamarthée B, Couturier M, Saas P. Interleukine 22: Son rôle dans la maladie du greffon contre l'hôte. *médecine/sciences*. juin 2013;29(6-7):577-9.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

L'Interleukine-22 contribue à la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules hématopoïétiques

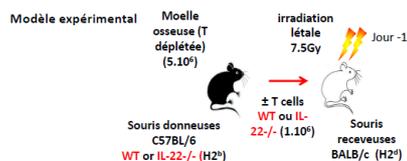
M Couturier, B Lamarthée, P Saas et B Gaugler

INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, Besançon, France

Objectifs

L'allogreffe de cellules hématopoïétiques (allo-CH) est une thérapie pour les patients atteints d'hémopathies malignes. Cependant, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) reste une complication majeure après allo-CH entraînant une morbidité et mortalité importante. La GVHD aiguë (aGVHD) correspond à une réponse immunitaire inflammatoire exacerbée qui conduit à la destruction des tissus sains du receveur par les cellules immunitaires du donneur. L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine essentielle à la défense de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires au niveau des muqueuses. Elle est produite aussi bien par des cellules de l'immunité innée qu'adaptative. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ (Th1, Th17, Th22), les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules NKT, les cellules lymphoïdes de l'immunité innée sont autant de sources d'IL-22. Le récepteur IL-22R n'est pas exprimé sur les cellules hématopoïétiques, mais exclusivement sur des cellules épithéliales des tissus comme la peau, l'intestin, le colon et le poumon. L'IL-22 permet la production de médiateurs inflammatoires, comme l'IL-6, IL-1 β , le G-CSF ou des chimiokines CXCL1 et CXCL9. La signalisation dérégulée de la cascade IL-22/IL-22R est impliquée dans les maladies inflammatoires de l'intestin. **Compte-tenu des propriétés de l'IL-22 dans les tissus qui sont le plus souvent la cible de la GVHD, nous avons évalué sa contribution dans le développement de cette maladie en utilisant un modèle expérimental de GVHD aiguë.**

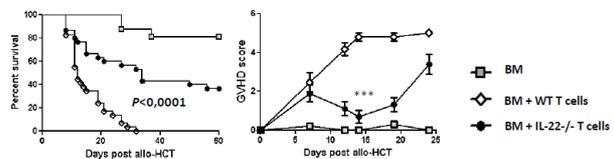
Méthodologie



Les scores cliniques sont déterminés au cours du suivi post-greffe (perte de poids, posture, intégrité et texture de la fourrure). Les plasmas sont dosés pour leur contenu en cytokine en ELISA à J7 post-greffe. Les splénocytes sont analysés en cytométrie de flux à J7 et J14 post-greffe pour analyser les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

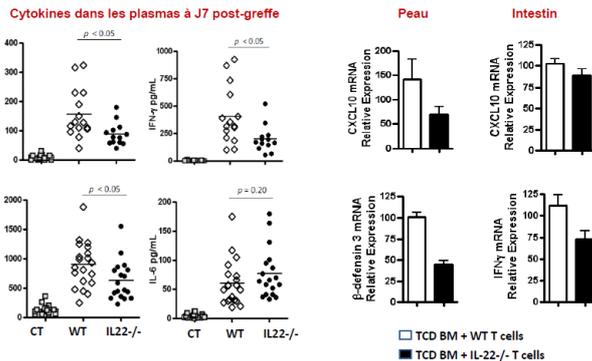
Résultats / Conclusion

1- L'absence d'IL-22 dans les lymphocytes T du donneur diminue la sévérité de la GVHD

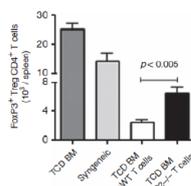


Les souris receveuses irradiées ont reçu de la moelle osseuse et des lymphocytes T de souris donneuses allogéniques soit sauvages (WT) soit déficientes pour l'IL-22. La survie des souris et les scores cliniques sont présentés sur les graphes (N=30 souris/groupe et 5 expériences indépendantes (log-rank test, P<0.0001 pour le groupe WT versus IL22^{-/-}).

2- L'absence d'IL-22 dans les lymphocytes T du donneur diminue l'inflammation systémique et dans les organes cibles de la GVHD



3- Augmentation des lymphocytes T régulateurs (Treg) à J6 post-greffe dans les souris ayant reçu des lymphocytes T déficients en IL-22



CONCLUSION:

Dans cette étude, nous avons montré que l'IL-22 provenant des lymphocytes T donneurs participe au développement et à la sévérité de la GVHD aiguë en contribuant à l'inflammation locale et systémique. La diminution de la sévérité de la maladie observée en absence d'IL-22 semble être dépendante des Treg. Les analyses vont être poursuivies pour déterminer l'effet de l'IL-22 provenant des cellules du receveur. Le ciblage de l'IL-22 pourrait à terme devenir une approche pour moduler la GVHD.

Développement et validation d'un modèle animal pour l'étude de l'intégration et de la ligamentisation d'une greffe de ligament croisé antérieur

Didier HANNOUCHE (Hôpital Lariboisière, Paris)

Le ligament croisé antérieur est un élément stabilisateur essentiel de l'articulation du genou. En cas de rupture, le traitement repose sur la ligamentoplastie par une autogreffe tendineuse de voisinage, dont les résultats sont globalement satisfaisants mais qui comporte un certain nombre d'inconvénients et de limites liés au prélèvement de l'autogreffe et à l'absence d'ostéo-intégration du transplant malgré une technique chirurgicale réussie et dont les mécanismes sont encore mal compris à ce jour. L'objectif de ce travail est de développer et de valider un modèle animal de ligamentoplastie du LCA par greffe tendineuse dans le double intérêt : (1) à court terme, d'améliorer la compréhension de l'intégration des greffes tendineuses, et (2) à plus long terme, d'utiliser ce modèle pour étudier des techniques d'ingénierie tissulaire, qui permettraient à l'avenir de palier aux autogreffes. Le modèle original de ligamentoplastie du LCA par allogreffe tendineuse sur des lapins modifiés génétiquement à la Green Fluorescence Protein (GFP) permet, par immunohistochimie, de réaliser un suivi cellulaire et ainsi d'étudier la survie cellulaire et la recolonisation du greffon, question majeure dans le cadre des greffes.

Nous nous proposons d'étudier l'intégration et la ligamentisation d'une allogreffe fraîche dans ce modèle animal et de la comparer à une allogreffe décellularisée traitée par le CO₂ supercritique, une méthode de stérilisation et de conservation actuellement utilisée pour les greffons osseux. Après avoir mis au point et validé le modèle de ligamentoplastie du LCA chez le lapin, nous évaluerons les conditions optimales de traitement d'allogreffes ligamentaires par le CO₂ pour l'obtention d'une matrice collagénique ligamentaire aux propriétés mécaniques conservées (ALT) et utilisable en pratique clinique. Une fois la matrice optimisée, nous étudierons l'intégration et la ligamentisation de l'allogreffe fraîche et de l'ALT dans le modèle animal.

Plusieurs paramètres sont étudiés : (i) la technique chirurgicale : évaluée par imagerie en coupe avec une analyse de la position des tunnels osseux et de leur corticalisation ; (ii) l'intégration de la greffe : étudiée par une analyse histologique pour l'étude du remodelage du collagène et de l'interposition d'un fibrocartilage, et par une analyse immunohistochimique pour l'analyse de la nécrose cellulaire et de la recolonisation au sein de la greffe ; (iii) la fonctionnalité de la greffe : étudiée par la réalisation de tests mécaniques.

Au terme de ce travail, un modèle animal de ligamentoplastie du LCA par greffe tendineuse reproductible sur le plan chirurgical a été établi. La meilleure connaissance des phénomènes de ligamentisation et d'ostéo-intégration de la greffe, leurs conséquences sur les tests mécaniques, et l'analyse de l'intégration d'une matrice naturelle décellularisée donnent des renseignements précieux et nécessaires pour orienter l'ingénierie tissulaire, véritable traitement d'avenir.

Administration de cellules souches mésenchymateuses dans le traitement de la maladie du greffon chez le transplanté cardiaque – Suivi immunologique

Richard ISNARD (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris)

La thérapie cellulaire représente un enjeu important en pathologie cardiaque. Nous proposons une étude pilote multicentrique, prospective, chez des patients transplantés cardiaques, ayant développé une vasculopathie coronaire sévère, visant à évaluer la faisabilité et la sécurité de l'administration intra-myocardique par voie percutanée de cellules souches mésenchymateuses (CSM) autologues issues de la moelle osseuse. Les cellules seront administrées fraîches, après conditionnement sous le volume requis, par le système NOGA. La dose maximale tolérée sera déterminée selon un schéma d'escalade de doses : 50, 100 et 200 millions de CSM avec des cohortes de 3 à 6 patients par palier de dose. Ces patients pourraient bénéficier de 2 propriétés des CSM, leurs fonctions réparatrices et immunomodulatrices. L'effet de l'administration intramyocardique de CSM sera apprécié sur la perfusion coronaire mesurée par tomoscintigraphie isotopique, la réserve contractile mesurée en échocardiographie et sur les paramètres IRM. L'étude de l'effet immunomodulateur des CSM fait l'objet de la demande de financement dans le présent appel d'offres.

Les études immunologiques effectuées sur les CSM ont pour but de confirmer que ces cellules prélevées chez des patients transplantés cardiaques, soumis à différents traitements immunosuppresseurs, ont les mêmes compétences immunologiques que celles prélevées chez des donneurs sains : nous étudierons les marqueurs impliqués dans la présentation de l'antigène, l'absence de capacité immunostimulante, les propriétés immunomodulatrice en culture mixte lymphocytaire. Le dosage des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9), des cytokines proinflammatoires, Th1/Th2/Th17, le TGF- β et l'IL-10, des molécules produites par les CSM et qui diminuent la réponse proliférative T (réalisés en Luminex) ainsi que leur capacité à induire des LT régulateurs permettra de mesurer les interactions CSM/LymphocytesT.

Nous rechercherons chez les patients l'induction d'un effet immunomodulateur secondaire à l'administration de CSM. Une analyse transcriptomique globale sera réalisée sur les biopsies endomyocardiques et les cellules du sang afin d'identifier une signature moléculaire potentielle de l'effet de l'injection intramyocardique de CSM. Nous effectuerons également un immunophénotypage en périphérie des sous populations lymphocytaires et de cellules dendritiques, une étude de la production des cytokines inflammatoires/TH1/TH2/TH17 et régulatrices ainsi que des chimiokines qui favorisent le homing des LT vers les tissus siège d'une réponse immune et des cytokines de la balance TH17/Treg. Enfin, nous évaluerons l'activation et la polarisation des LT après stimulation.

L'immunomonitoring sera effectué avant l'administration des cellules, à 48heures, 1, 3 et 6 mois post administration des CSM.

L'étude sera réalisée au sein de l'Institut de Cardiologie du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, de l'Institut du Thorax du CHU de Nantes et du service de cardiologie du CHU de Toulouse. Elle concerne des patients transplantés, en situation de rejet chronique contrôlé et il n'y a pas d'induction clinique de tolérance attendue. Par contre, elle permettra d'analyser avec prudence les éventuelles modifications de la réponse immune induites par l'administration des CSM dans ces conditions et en fonction nous permettront envisager une étude ultérieure d'utilisation des CSM pour le traitement des rejets.

Reconstruction de la voie de sortie du ventricule droit par un tube valve biorésorbable cellularisé autologue

David KALFA (INSERM)

Objectifs: Les moyens utilisés en pratique clinique pour la réparation chirurgicale de la voie de sortie ventriculaire droite (RVOT) dans les cardiopathies congénitales sont des matériaux inertes sans potentiel de croissance ni de régénération et conduisant à des reprises chirurgicales multiples.

Notre projet consiste en la création d'un tube valvé trifolié, en PLLA (acide poly-lactique lévogyre) entièrement biorésorbable, ensemencé de cellules souches mésenchymateuses (MSC) autologues issues de cordon ombilical, pour remplacement de la RVOT chez un modèle de gros animal néonatal en croissance.

Les objectifs principaux sont de:

- 1) remplacer la RVOT native chez l'ovine par une matrice tubulaire valvée trifoliée biorésorbable ensemencée de MSC autologues ;
- 2) restaurer une RVOT valvée autologue et vivante, présentant une compétence valvulaire à moyen- et long-terme ;
- 3) prouver le potentiel de croissance et l'absence de dégénérescence du produit d'ingénierie tissulaire chez un modèle d'agneau en croissance.

La preuve du concept a été réalisée par une première étude soutenue par l'Agence de la Biomédecine et nous incite à envisager le deuxième volet, destiné à tester le devenir d'un tube valvé dans un modèle néonatal de gros animal cliniquement pertinent.

Méthodologie : Le tube valvé polymérique biorésorbable sera constitué de PLLA tissé, avec un délai de perte de 50% de résistance mécanique de 12 mois. Les feuillets valvulaires seront découpés, thermoformés et moulés avant la phase d'assemblage tube/feuille. Des tests mécaniques *in vitro* évalueront les indices mécaniques du tube et de la valve. Des MSC autologues issues du cordon ombilical de l'agneau chez qui le tube sera implanté seront ensemencées en conditions statiques ($3,5 \times 10^6$ MSC /cm² pendant 4 jours), puis en conditions dynamiques dans un bioréacteur pendant 4 semaines. Après évaluation biologique *in vitro*, les tubes seront implantés sous CEC en position orthotopique chez l'agneau pesant 12 à 20kg. Les résultats seront évalués par échocardiographie, IRM, histologie, immunohistochimie, dosage calcique et tests mécaniques. Une première série préliminaire d'implantation de tubes non valvés ensemencés de MSC autologues (n=6) aura pour objectif d'évaluer leurs propriétés mécaniques et biologiques et le type de recouvrement de surface optimal. Une deuxième série (n=6) déterminera l'origine des cellules constituant le néo-tissu, grâce à l'implantation de tubes ensemencés de MSC non autologues de sexe opposé à celui de l'animal receveur. Enfin, l'évaluation préclinique de l'absence de dégénérescence du tube valvé, de son potentiel de croissance et de sa compétence valvulaire reposera sur l'étude de 20 tubes valvés ensemencés de MSC de cordon ombilical autologues implantés chez l'agneau nouveau-né, avec un suivi de 2 mois à 3 ans.

Résultats attendus: Le résultat espéré de ce remplacement de la RVOT par un tube valvé biorésorbable ensemencé de MSC autologues, chez ce modèle animal néonatal en croissance, est à terme la restitution *ad integrum* d'une néo voie de sortie droite autologue, vivante, douée d'un potentiel de croissance, évitant ainsi la morbidité et la mortalité majeures inhérentes à la chirurgie actuelle. Le caractère non invasif et immédiatement disponible des MSC de cordon ombilical rend une application clinique potentielle d'autant plus pertinente chez le nouveau-né atteint de cardiopathie congénitale que le diagnostic anténatal de ces malformations permet d'anticiper le traitement.

Evaluation du processus d'information dans le cadre de greffe intracérébrale de cellules embryonnaires

Patrick MAISON (Hôpital Henri Mondor)

Le processus d'information et de consentement éclairé qui est légalement et éthiquement au centre de la conduite sur la recherche de l'homme doit être adapté aux spécificités des recherches et du soin (potentiel) par i) greffe de cellules ii) notamment de cellules fœtales iii) en intracérébrale. L'essai MigHD (multicentric intracerebral fetal grafting trial in Huntington's disease) offre une opportunité unique d'aborder cette question. En effet, il s'agit d'un essai de grande ampleur sur l'efficacité des greffes de cellules fœtales en intracérébrales chez des patients atteints de maladie de Huntington. Cette étude ancillaire à l'essai vise à examiner à travers un questionnaire et des entretiens, la compréhension et les perceptions du processus d'information et de consentement éclairé à court et à long terme par les patients et leurs accompagnants. Elle vise à évaluer la capacité des patients à donner un consentement éclairé sur les différents aspects de cet essai. Elle permettra aussi d'évaluer l'intérêt de l'association d'un accompagnant au processus de consentement. Cette étude est unique car elle est la première évaluation du processus de consentement éclairé, écrit et oral dans le cadre d'un essai de transplantation intracérébrale de cellules fœtales à grande échelle et au long terme. Cette étude permettra d'identifier les failles et les attentes des patients et de leurs accompagnants sur le processus de consentement dans ce contexte. Nous pourrions ainsi proposer des solutions d'amélioration de ce processus pour chacun des points spécifiques au contexte : greffe de cellules, cellules d'origine fœtale, greffe intracérébrale. Ces mesures pourront concerner l'information et les moyens nécessaires à sa compréhension et rétention dans le cadre de la recherche et du soin.

Les participants inclus dans la présente étude (patients et accompagnants) sont invités à remplir un questionnaire à questions ouvertes ou fermées à trois reprises lors de l'essai MIGH-HD. Il s'agit d'un essai de phase III randomisé évaluant l'allogreffe fœtale dans la maladie de Huntington chez 60 patients francophones. La randomisation à 12 mois (M12) est effectuée de manière à déterminer si les patients seront greffés à M13 et M14 ou plus tardivement à M33 et M34. La comparaison principale a lieu à M32 entre les deux groupes. Les greffes à M33 et 34 sont réalisées à titre compassionnelle et permettront de comparer les pentes d'évolution des patients avant et après greffe. Le questionnaire de l'étude ancillaire concernant ce projet est proposé après M1 (signature du consentement), après M12 (à 1 an) et après la dernière visite M52 (à 4 ans et 4 mois). Huit centres francophones (en France et Belgique) participent au projet. 50 patients et 31 accompagnants ont déjà répondu aux deux premières passations du questionnaire. Faute de moyen humain, les questionnaires n'ont pu être proposés à l'ensemble des 60 participants à l'essai MIGHD. Pour les patients et accompagnants déjà inclus, il reste à compléter les passations de M52 en 2011-12 pour ces 50 patients et 31 accompagnants et l'organisation de focus groupe.

Le questionnaire a été conçu pour évaluer à court et long terme chez le patient et l'accompagnant :

- 1) la compréhension: sur les différents éléments spécifique et non spécifique de l'essai et du traitement

- 2) la satisfaction de l'information sur ces points

- 3) les attentes et les motivations

Les analyses qualitative et statistique seront descriptives et comparatives. Les avis réglementaires nécessaires (CCTIRS et CNIL ont obtenu). La fin de cette étude ancillaire est prévue pour fin 2012.

Thérapie de la porphyrie érythropoïétique congénitale à l'aide des cellules souches pluripotentes induites

François MOREAU-GAUDRY (Université Bordeaux 2)

La thématique de recherche principale de notre laboratoire porte sur la thérapie génique des maladies génétiques et en particulier de la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC). C'est une maladie autosomique caractérisée par un déficit en URO III synthase (UROS). La sévérité de la maladie et l'absence de traitement spécifique en dehors de la greffe de moelle, lorsqu'il existe un donneur HLA compatible, sont des arguments forts pour évaluer la faisabilité de la thérapie génique pour cette maladie. Un vecteur lentiviral exprimant l'ADNc UROS a déjà permis la correction d'une souris transgénique PEC.

La découverte majeure des facteurs de transcriptions nécessaires pour la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes, appelées iPSC, ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine la thérapie génique et de la médecine régénérative. Les cultures cellulaires de cellules humaines *in vitro* différenciées à partir d'iPSC pourraient constituer un complément essentiel aux études sur les modèles animaux de la maladie.

Deux problèmes principaux limitent le développement de la thérapie génique des maladies immuno-hématologique : le premier est la disponibilité des cellules. Le nombre minimal de cellules souches hématopoïétique (CSH) CD34⁺ nécessaires pour une complète reconstitution n'est pas toujours atteint. L'obtention d'un grand nombre de CSH à partir de quelques iPSC permettrait de lever cette limitation. Le deuxième problème est le risque de mutagenèse insertionnelle due à l'activation d'un oncogène par le promoteur du provirus au voisinage du site d'intégration. Pour prévenir ce risque, la localisation du site d'intégration du provirus pourra être caractérisée par LAM PCR.

Notre approche méthodologique réside dans le développement d'un système d'expression transitoire des facteurs de transcription soit en utilisant des vecteurs lentiviraux excisables par un système CRE/Lox soit par la transfection d'ARN modifiés codant pour les facteurs de reprogrammation.

1°) Dans le **projet humain** la génération d'iPSC humaines sera obtenue à partir de fibroblastes, de kératinocytes et de CD34⁺ provenant de patients PEC. Les cellules somatiques seront préalablement corrigées à faible multiplicité d'infection suivie de la génération d'iPSC. Le séquençage du site d'intégration provirale permettra de choisir les clones iPS contenant une insertion silencieuse à distance de tout oncogène. Les CSH dérivées d'iPSC seront ensuite purifiées et caractérisées par greffe dans des souris immunodéficientes.

2°) **Dans le projet murin**, les cellules somatiques choisies seront soit des fibroblastes soit des CSH murines (Sca+/lin-) provenant de notre modèle PEC. La génération d'iPSC à partir de cellules corrigées sera également réalisée par vecteur lentiviral excisable ou ARN. Les iPSC corrigées seront différenciées en CSH, purifiées, puis transplantées dans des souris PEC receveuses préalablement conditionnées par injection de Busulfan.

L'enjeu de ce projet est d'évaluer l'intérêt de la thérapie génique associée à la génération de cellules iPS dans un modèle de maladie héréditaire hématologique : la PEC.

Publication :

Bedel A, Taillepierre M, Guyonnet-Duperat V, Lippert E, Dubus P, Dabernat S, et al. Metabolic Correction of Congenital Erythropoietic Porphyria with iPSCs Free of Reprogramming Factors. The American Journal of Human Genetics. juill 2012;91(1):109-21.

Evaluation du statut viral HPV chez des patients avant et après transplantation rénale à l'ère de la vaccination contre les HPV

Christiane MOUGIN (Université de Franche-Comté)

L'immunosuppression instaurée chez les patients transplantés rénaux est essentielle pour limiter le rejet du greffon. Elle expose aussi les patients à un risque accru de développement de lésions (pré)cancéreuses anogénitales associées aux papillomavirus humains (HPV). Ainsi, une récente méta-analyse indique que le rapport d'incidence standardisée pour les cancers associés aux HPV augmente de façon importante dans cette population : RIS de 2,13 (IC95% 1,37 - 3,30) pour le cancer du col de l'utérus, RIS de 22,76 (IC95% 15,8 - 32,7) pour les cancers de la vulve et du vagin, RIS de 15,8 (IC95% 5,79 - 34,40) pour le cancer du pénis et RIS de 4,85 (IC95% 1,36 - 17,3) pour le cancer de l'anus. De fait, les patients transplantés doivent faire l'objet d'une surveillance particulière pour déceler l'apparition et/ou la progression de lésions (pré)cancéreuses, en particulier au niveau anogénital. Les données relatives à l'infection par HPV au niveau de la sphère génitale de patients transplantés rénaux sont peu nombreuses et concernent des cohortes avec un nombre modeste de sujets.

L'objectif principal est de comparer la prévalence des génotypes d'HPV à haut risque oncogène (13 HPV haut risque) au niveau de la sphère anogénitale et les réponses immunes humorales périphériques anti-HPV (Ac totaux et neutralisants) avant et après transplantation rénale. Nous nous sommes fixés plusieurs objectifs secondaires (i) étudier la prévalence de l'HPV au niveau de la sphère anogénitale, chez les patients insuffisants rénaux chroniques inscrits sur liste d'attente de greffe, (ii) établir s'il existe une corrélation entre infection HPV et réponse immune avant et après transplantation, (iii) établir s'il existe un lien entre infection HPV et immunosuppression (durée, type de molécule) et (iv) établir s'il existe un lien entre réponse immune et immunosuppression (durée, type de molécule).

Nous devons inclure 674 hommes et femmes de plus de 18 ans inscrits sur liste d'attente de greffe en vue d'une première transplantation rénale dans un des CHU participant à l'étude (Besançon, Dijon, Nancy, Reims et Strasbourg). Au cours du bilan pré-transplantation et des visites posttransplantation habituelles (à 3 mois et 1 an), les patients bénéficieront outre d'un examen clinique, d'un dépistage de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (frottis effectués pour cytologie et recherche d'HPV), du pénis et de l'anus (frottis effectués pour la recherche d'HPV). Les échantillons dédiés à la recherche d'HPV seront génotypés par PCR/hybridation afin de connaître les types d'HPV présents. Toute lésion constatée au cours du suivi sera prise en charge selon les recommandations en vigueur. Un prélèvement sanguin sera effectué à chaque bilan et le jour de la greffe afin de rechercher par ELISA la présence d'anticorps spécifiques des HPV16 et 18.

Cette étude nous permettra de décrire de façon précise la prévalence des HPV au niveau de la sphère anogénitale chez des patients insuffisants rénaux avant et après transplantation. Nous nous attendons à observer une augmentation de la prévalence des infections en lien avec l'immunosuppression. Par ailleurs, si nous montrons que le portage en HPV16 ou 18 augmente significativement après transplantation, nous conduirons une réflexion sur l'éligibilité de patients non concernés par les recommandations actuelles à une vaccination prophylactique contre les HPV16/18.

Evaluation chez le mini-porc de la survie et de la sécrétion des îlots de Langerhans greffés dans le muscle lors d'une CO-TX avec des progéniteurs endothéliaux circulants (PECS)

François PATTOU (CHRU Lille)

Contexte scientifique : La thérapie cellulaire est un traitement émergent pour le diabète de type 1, fondé sur le succès prolongé de la transplantation intraportale d'îlots. Son optimisation comprend le développement de sites alternatifs d'implantation. Parmi la variété de sites potentiels, la voie intramusculaire offre des propriétés attractives, notamment en termes d'accessibilité du greffon pour un suivi biologique. Néanmoins la mauvaise revascularisation des îlots transplantés dans les premiers jours de la greffe peut représenter un obstacle qui limite la prise de greffe. Ainsi, les îlots peu vascularisés ont un apport en oxygène et en nutriments limités, ce qui compromet leur capacité de colonisation et leur survie. Les progéniteurs circulants des cellules endothéliales (PECs) sont déjà connus pour induire efficacement une néovascularisation dans des modèles d'ischémie tissulaire. En cotransplantation avec des îlots, ils pourraient accélérer la vascularisation du greffon.

Objectifs : Cette étude teste l'hypothèse que la cotransplantation d'îlots avec des PECs par voie intramusculaire améliore la survie et la fonction du greffon.

Matériels et méthodes : la première année, les îlots de 6 miniporcs seront autotransplantés dans les muscles graciles après pancréatectomie caudale. Chaque miniporc recevra deux autogreffes : une greffe associée à des PECs dans le muscle gracile droit et l'autre greffe sans PECs dans le muscle gracile gauche. Un mois après la transplantation, la fonction de chaque greffon sera évaluée après totalisation de la pancréatectomie par la mesure de l'insulinémie après test de stimulation au glucose en excluant le greffon controlatéral. Les miniporcs seront suivis pendant un mois afin d'évaluer l'équilibre glycémique régulé par les greffons. Les cellules β , les PECs et les vaisseaux sanguins seront évalués par immunomarquage anti insuline, vWf et CD31. La vascularisation du greffon sera suivie par des techniques d'imagerie non invasive. La seconde année, nous étudierons l'effet dose des PECs pour l'optimisation du greffon.

Résultats attendus : Valider que la co-injection de PECs et d'îlots améliore la prise de greffe, et la survie à long terme du greffon en améliorant sa vascularisation. Par ailleurs, cette meilleure vascularisation du greffon permettra une meilleure disponibilité de l'insuline, qui passera plus facilement dans le sang périphérique. Le modèle préclinique choisi, grâce à son caractère prédictif, permettra un transfert rapide à la clinique.

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

Eric RONDEAU (Hôpital Tenon, Paris)

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

Objectifs :

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

Résultats attendus :

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

Méthodologie :

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

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

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

Rondeau Eric

Inserm UMR_S1155, Maladies rénales rares et communes, Remodelage de la matrice et réparation tissulaire, Hôpital Tenon, Paris, France; Université de la Sorbonne, UPMC, Paris, France; Urgences Néphrologiques et transplantation rénale APHP, Hôpital Tenon, Paris, France

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

Objectifs :

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

Méthodes

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

Résultats

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

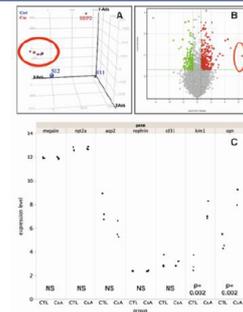


Microdissection laser des tubules

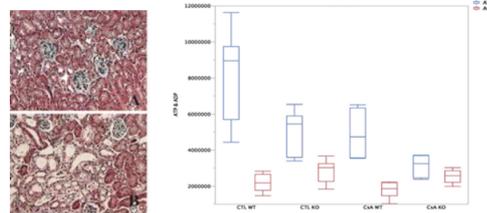
Extraction, RT des ARN et amplification

Analyse statistique

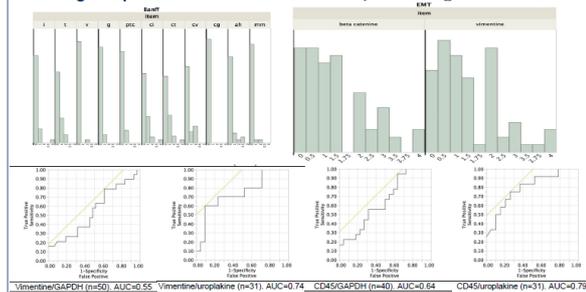
KEGG Pathway	Genes count	Odds Ratio	p-value	Discovery Rate
Ribosome	66	47	6.97×10^{-16}	1.44×10^{-16}
Protein processing in endoplasmic reticulum	140	10	2.86×10^{-10}	2.96×10^{-10}
Protein export	21	46	7.29×10^{-10}	5.03×10^{-10}
Peroxisome	66	8	2.2×10^{-14}	9.13×10^{-14}
Terpenoid backbone synthesis	12	26	4.12×10^{-12}	1.22×10^{-12}



Rôle protecteur de Nupr1 contre la toxicité de la CSA:



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



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

Préservation et évaluation pulmonaire *in situ* par perfusion froide percutanée dans le cadre du prélèvement d'organes à cœur arrêté : Évaluation de la faisabilité chez le porc

Nicolas SANTELMO (CHRU Strasbourg)

Le prélèvement d'organes 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 point de vue éthique 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-six 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.

Nous avons conduit une étude, subventionnée par l'Agence de la Biomédecine en 2009 et 2010, qui nous a permis de démontrer que notre modèle de perfusion sélective de la petite circulation par une solution de Perfadex froide permet une conservation sans détérioration morphologique ni fonctionnelle des poumons chez le porc. Cette étude a été conduite à « thorax ouvert » pour des raisons de mise à point du modèle mais aussi de carence de financement. Les résultats, qui apparaissent très prometteurs avec notamment une conservation optimale jusqu'à 8 heures après l'arrêt cardiaque, sont en cours de publication.

Avec ce projet actuel, nous avons l'intention de développer deux canules permettant la mise en route percutanée de la perfusion avec évaluation fonctionnelle du bloc bipulmonaire « *in situ* », par abord direct de la carotide gauche et de la jugulaire droite, ainsi que de confirmer les résultats de la première étude avec un groupe témoin.

Nous avons pour cela l'accord de principe du laboratoire Avalon pour la réalisation de ces prototypes. Cette deuxième phase de notre étude se déroulera chez l'animal de laboratoire (porc de 30/40 kg). Nous envisageons de comparer deux groupes d'animaux, un premier groupe (A) perfusé par une solution de Perfadex et sang de l'animal avec notre modèle expérimental percutanée, un deuxième groupe témoin (B) préservé par simple refroidissement topique pleural (topical cooling, méthode de référence actuelle) avec deux drains pleuraux de chaque côté.

Dans le groupe B, après 6 heures, le système de perfusion sera aussi mis en route afin d'évaluer l'état fonctionnel et structural des organes ainsi conservés.

Sur ces organes préservés *in situ* (groupes A et B), il est prévu d'analyser, en fonction de la durée de l'ischémie froide, les modifications morphologiques, métaboliques, fonctionnelles et hémodynamiques qui surviennent après l'arrêt cardiaque.

Nous souhaitons ainsi comparer notre modèle avec la méthode de référence, forts des résultats jusque-là obtenus dans notre précédente étude et rendre plus simple et sûr le prélèvement pulmonaire dans le cadre des donneurs à cœur arrêté qui pourrait ainsi devenir faisable en France de façon adaptée à la législation locale.

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;26(10):1027-37.

Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pédiatrique

Ghislaine STERKERS (Hôpital Robert Debré, Paris)

Les infections virales sont une cause importante de morbidité et de mortalité après greffe de CSH particulièrement chez l'enfant. Le cytomegalovirus (CMV) est le plus souvent en cause dans les infections virales opportunistes. Les infections dues aux virus influenza peuvent également entraîner des symptômes cliniques sévères. Les infections à adénovirus (AdV) posent un problème spécifiquement chez l'enfant avec une mortalité s'élevant jusqu'à 50% en cas de virémie. Des progrès en matière de diagnostic par l'utilisation des techniques de PCR ainsi que l'amélioration des protocoles de chimiothérapies antivirales (au prix d'une toxicité non négligeable) ont permis d'améliorer le pronostic. Le transfert de lymphocytes immuns reste la seule alternative en cas de déficit immunitaire profond.

Qui ?, quand ? et comment traiter ? reste une question de première importance.

L'utilisation en soins courants de marqueurs biologiques immunologiques prédictifs du risque infectieux pourrait répondre à ces questions.

Nos travaux depuis 2007 ont permis de 1) déterminer les « normes » des réponses immunes cellulaires anti-CMV et -AdV chez l'enfant (Pédrón B et al. *Pediatric Research* Epub ahead 2010), 2) identifier des biomarqueurs immunologiques corrélés avec une protection versus un risque majeur d'infection sévère à AdV et CMV (El Khourouj VG et al. *Biol Bone Marrow Transplant* 2010 et Guérin, V et al. *Bone Marrow Transplant* 2010), 3) produire et évaluer des préparations de CTL anti-AdV à visée de transfert adoptif (Aissi-Rothé et al *J Immunother* 2010) et 4) d'évaluer en condition de génoidentité, les délais post-greffes compatibles avec une immunogénicité des vaccins influenza.

Notre projet identifiera les biomarqueurs immunologiques les plus pertinents pour :

- 1) alléger les surveillances virologiques (onéreuses) et sursoir aux traitements préemptifs (exposant à des complications) sur la base de la récupération d'une immunité cellulaire efficace, 2) prescrire précocement des infusions de CTL pour les enfants répliatifs incapables de développer des réponses immunes efficaces.
- 3) définir le timing optimal des vaccinations anti-influenza en condition de phénoïdentité et/ou identité HLA partielle.

Pour ce faire, 50 enfants consécutifs à haut risque infectieux (greffes phénoïdentiques \geq 9/10, haploïdentiques et sang de cordon) seront inclus sur une période de 18 mois avec un suivi minimum de 6 mois. Les résultats des PCR systématiques dans le sang (AdV, CMV), dans les selles (AdV), hebdomadaires et dans les sécrétions nasales en cas de symptômes grippal seront confrontés à la numération de lymphocytes T-IFN γ ⁺ spécifiques des virus CMV, AdV et influenza et aux symptômes cliniques.

Publication :

Jeljeli M, Guérin-El Khourouj V, Porcher R, Fahd M, Leveillé S, Yakouben K, et al. Relationship between cytomegalovirus (CMV) reactivation, CMV-driven immunity, overall immune recovery and graft-versus-leukaemia effect in children. *Br J Haematol*. 1 juill 2014;166(2):229-39.