

APPEL D'OFFRES 2012 « Recherche et Greffe »
Résumés résultats et publications

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
CAILLAT-ZUCMAN Sophie	<u>Etude de la reconstitution des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant</u>	4
NOEL Danièle	<u>Microsphères de collagène pour la vectorisation et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses : Alternative à la greffe de cartilage</u>	5
WOJTUSCISZYN Anne	<u>Préservation de l'activité protéasomale au sein des îlots de Langerhans afin d'améliorer la masse fonctionnelle bêta pancréatique lors de greffe</u>	2
CHAMPAGNE Eric	<u>Facteurs immunologiques associés à la persistance du virus de l'hépatite E chez les transplantés d'organes</u>	4
FERRERA René	<u>Amélioration de la préservation des greffons cardiaques avant transplantation par l'utilisation d'un nouveau procédé de perfusion par perfusion pulsatile hypothermique</u>	2
ELBIM Carole	<u>Réponses fonctionnelles des Polynucléaires Neutrophiles vis-à-vis d'Aspergillus fumigatus chez les patients allogreffés de moelle osseuse</u>	4
PINSARD Michel	<u>Comparaison de deux stratégies pour la réalisation de l'épreuve d'apnée dans le diagnostic de la mort encéphalique chez le donneur potentiel d'organes. CPAPNEE STUDY</u>	2
PERRUCHE Sylvain	<u>Injection de cellules apoptotiques en allogreffe de cellules hématopoïétiques, du laboratoire au lit du patient</u>	5
HERMINE Olivier	<u>Rôle et mécanismes immunomodulateurs des NKT invariants humains après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques</u>	4
IVANOVIC Zoran	<u>Amélioration technique de l'expansion ex vivo des cellules hématopoïétiques de sang placentaire de grade clinique (utilisée pour le protocole de recherche clinique «GRAPA»)</u>	5
AUGE Nathalie	<u>Rôle des sphingolipides et de MMP-2 dans le développement du rejet chronique vasculaire médié par l'alloréaction</u>	3/4
EL-CHEIKH Jean	<u>Etude pharmacocinétique du Busulfan dans le conditionnement d'une greffe allogénique chez des patients à haut risque porteurs d'hémopathies</u>	3
BRUNEVAL Patrick	<u>Rejet humoral infraclinique en transplantation cardiaque : incidence et relation avec la maladie vasculaire du greffon</u>	4
RETIERE Christelle	<u>Rôle anti-leucémique des cellules Natural Killer médié par les KIR activateurs</u>	4
CHARREAU Béatrice	<u>Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon</u>	4

CARIOU Alain	<u>Caractéristiques des donneurs potentiels dans le cadre du processus DDAC-Maastricht III au cours du coma postanoxique</u>	1
KERR-CONTE Julie	<u>Influence de l'obésité sur les caractéristiques fonctionnelles des îlots humains : Les îlots d'obèses sont-ils les meilleurs îlots pour la thérapie cellulaire du diabète ?</u>	5
GUETTIER Catherine	<u>Identification des critères diagnostiques du rejet humoral en transplantation hépatique</u>	4

THEMES DE RECHERCHE

- 1) Sciences humaines, économiques et sociales dans le domaine du prélèvement, de la greffe et de l'insuffisance terminale d'organes : études dans le domaine de la santé publique / épidémiologie et/ou de l'éthique**
- 2) Amélioration des prélèvements et de la qualité des greffons, modalités de conservation**
- 3) Pharmacologie et greffe**
- 4) Immunologie de la transplantation chez l'Homme**
- 5) Ingénierie cellulaire et tissulaire comme alternative à l'allogreffe d'organes, de tissus ou de cellules**
- 6) Prévention des risques sanitaires dans les domaines du prélèvement et de la greffe**

Etude de la reconstitution des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant

Sophie CAILLAT-ZUCMAN (INSERM, hôpital Robert Debré, Paris)

La reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une étape capitale qui va permettre au patient de retrouver des moyens de défense efficaces contre les agents pathogènes et les cellules tumorales. Il est donc crucial de bien comprendre la dynamique de reconstitution des différents composants du système immunitaire, afin de déterminer leur rôle respectif dans la survenue des infections et des rechutes leucémiques, mais également dans la survenue de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

Les cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) représentent une sous-population récemment décrite de lymphocytes T CD3+ qui expriment un TCR invariant V α 7.2-J α 33 restreint par la molécule d'histocompatibilité non classique et non polymorphe MR1. La fréquence des MAIT est élevée dans le sang circulant (1-8% des lymphocytes T CD3), et plus encore dans l'intestin et le foie, deux sites préférentiels de la GVHD. A la différence des lymphocytes T conventionnels, les MAIT s'activent très rapidement et sans stimulation antigénique préalable, notamment en présence de cellules infectées par des agents pathogènes bactériens ou fongiques, ce qui suggère qu'ils pourraient exercer d'importantes fonctions antimicrobiennes. Alors que la reconstitution des lymphocytes T conventionnels après greffe est bien étudiée, il n'existe aucune donnée sur la reconstitution des MAIT et sur les conséquences pathologiques éventuelles associées à une anomalie quantitative ou qualitative de leur reconstitution. Deux caractéristiques essentielles des MAIT, leur fonction antimicrobienne et leur localisation digestive préférentielle, nous incitent tout particulièrement à étudier leur contribution dans le contrôle des infections et dans la survenue d'une GVHD. Nos objectifs sont:

1/ d'analyser de manière séquentielle en cytométrie de flux multiparamétrique la reconstitution des MAIT dans le sang circulant au cours de la 1^{ère} année après allogreffe de CSH chez 60 enfants greffés dans le Service d'Hématologie Pédiatrique de l'hôpital Robert Debré (Paris) sur une période de 12 mois.

2/ d'étudier la corrélation éventuelle entre la reconstitution des MAIT et la survenue de GVHD, d'infection ou de rechute leucémique.

Le nombre absolu et la fréquence des cellules MAIT seront déterminés en cytométrie de flux 8 couleurs, simultanément à la quantification des lymphocytes conventionnels réalisée systématiquement en routine 1, 3, 6 et 12 mois après greffe. Les MAIT seront identifiés par la coexpression des marqueurs CD3+, V α 7.2+ CD161^{high} sur les lymphocytes CD4-CD8 α +. Cette étude longitudinale sera réalisée sur 2 ans : tous les enfants étant inclus au terme de la 1^{ère} année, le dernier point de suivi à 12 mois sera complété à la fin de la 2^{ème} année.

Les résultats de cette étude permettront de savoir si le suivi de la reconstitution des cellules MAIT représente un élément de surveillance utile pour identifier les patients à risque d'infection, de GVHD ou de rechute.

Publication :

Youssef GB, Tourret M, Salou M, Ghazarian L, Houdouin V, Mondot S, et al. Ontogeny of human mucosal-associated invariant T cells and related T cell subsets. Journal of Experimental Medicine. 5 févr 2018;215(2):459-79.

Microsphères de collagène pour la vectorisation et la différenciation de cellules souches mésenchymateuses : Alternative à la greffe de cartilage

Danièle NOEL (INSERM, université de Montpellier)

En raison de ses faibles capacités d'auto-régénération, le cartilage articulaire subit une dégradation progressive au cours du vieillissement, lors de traumatismes ou dans les pathologies ostéo-articulaires, telles que l'arthrose ou la polyarthrite rhumatoïde. Ce processus peut causer des handicaps fonctionnels importants et, avec l'augmentation de l'espérance de vie, représente un problème majeur de santé public. Les traitements actuellement disponibles reposent essentiellement sur l'autogreffe ou l'allogreffe de cartilage et, la pose de prothèses en dernier recours. Une approche thérapeutique prometteuse est l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) car elles ont la capacité de se différencier en chondrocytes ; elles sont aisément isolées de la moelle osseuse ou de tissu adipeux et peuvent être amplifiées *ex vivo* en quantités compatibles à une utilisation clinique.

Dans une perspective d'ingénierie tissulaire du cartilage, il est important que les CSM soient associées à une matrice-support afin d'une part, d'apporter les cellules directement dans la lésion à réparer et d'autre part, d'éviter leur dispersion au moment de leur implantation. Outre la nécessité de les combiner avec un biomatériau, l'addition d'un facteur de croissance, tel que le TGF β 3, devrait permettre de favoriser, *in situ*, la différenciation des CSM en chondrocytes. En vue d'une application clinique, il n'est pas envisageable, ni souhaitable, d'injecter du TGF β 3 à intervalles réguliers dans les articulations de patients. Notre projet vise donc à faire libérer du TGF β 3 par des microsphères de collagène de type I qui serviront de support à l'adhésion et la différenciation des CSM ; l'ensemble CSM+microsphères sera immobilisé dans un gel peu dense de collagène de type I qui pourra être injecté localement, limitant ainsi une intervention chirurgicale invasive.

Les étapes principales de ce projet sont les suivantes :

- 1- Optimisation de la fonctionnalisation des microsphères et évaluation de la cinétique de libération du TGF β 3,
- 2- Evaluation de la différenciation des CSM en chondrocytes après adhésion sur les microsphères et inclusion dans un gel peu dense de collagène,
- 3- Evaluation *in vivo* de la capacité des CSM+microsphères+gel à former du cartilage en localisation ectopique et réparer du cartilage de genou de souris arthrosiques.

Publication :

Mathieu M, Vigier S, Labour MN, Jorgensen C, Belamie E, Noël D. Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres. *European cells & materials*. 2014;28:82–97.

Poster



Collagen-based microspheres for differentiation of mesenchymal stem cells: a potential strategy for cartilage engineering



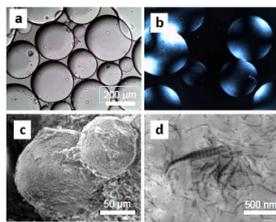
Marc Mathieu¹, Emmanuel Belamie^{3,4}, Silvine Benth^{1,3,4}, Sylvain Vigier^{1,3,4}, Christian Jorgensen^{1,2}, Danièle Noël¹
¹Inserm U844, Montpellier, France; ²Service d'Immuno-Rhumatologie Thérapeutique, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, France; ³Ecole Pratique des Hautes Etudes, Paris, France; ⁴Institut Charles Gerhardt, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, Montpellier, France. E-mail: marc.mathieu@inserm.fr, danièle.noel@inserm.fr

Introduction

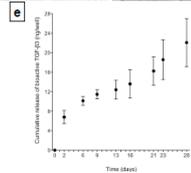
Because of poor self-healing ability, joint cartilage can undergo irreversible degradation in the course of ageing or after injury. For cartilage engineering, one promising therapeutic approach is the use of mesenchymal stem cells (MSC) in combination with a carrier biomaterial and differentiation factor. We investigated whether self-assembled collagen microspheres could serve as an efficient reservoir for TGF-β3 and as a carrier for MSC to promote their differentiation into chondrocytes *in vitro* and elicit the formation of cartilage at ectopic sites *in vivo*.

1 - Characterization of the collagen microspheres

The particles obtained from the perfluorated emulsion exposed to ammonia vapours appeared round and smooth, and mostly transparent (a). Observations in polarized light revealed a strong birefringence (b) arising from the self-assembly of collagen triple helices into locally aligned fibrils. The fibrillar nature and spherical shape of collagen particles was confirmed by scanning electron microscopy (c). Transmission electron microscopy of ultra-sectioned microspheres showed that the matrix is comprised of an interconnected network of very small (10-15 nm) fibrils, and larger ones (~50 nm wide) clearly exhibiting the native 67 nm striation (d). The particles size distribution determined directly from microscopic images gave a median diameter of 300 ± 67 μm.

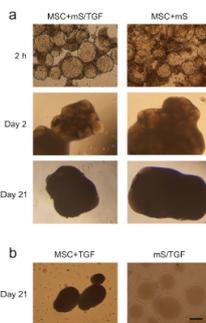


The microspheres were loaded with 50 ng of TGF-β3 per 100 microspheres. We then measured the cumulative release of bioactive TGF-β3 over 28 days using a reporter gene assay. The scaffold progressively released the growth factor over the whole time period (e).



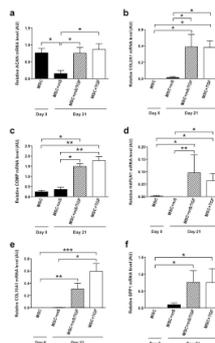
2 - Adhesion of MSC on microspheres

MSC were cultured with TGF-β3-loaded microspheres (MSC+mS/TGF) in plates with ultra-low attachment surface. Two hours later, the cells were attached to the microspheres and had started to induce their aggregation via cell bridges. Frequently, a single cluster was formed over time, with a particularly dense and opaque appearance at day 21 (a, left panels). Progressive formation of similar aggregates was also observed when MSC were cultured with unloaded microspheres (MSC+mS) (a, right panels). In the absence of microspheres, these also eventually formed micromasses (b, left panel). TGF-β3-loaded microspheres incubated in the absence of cells (mS/TGF) remained intact and did not form aggregating complexes (b, right panel). Bar = 200 μm.



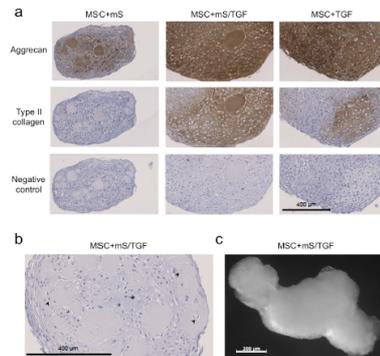
3 - Expression of chondrogenic markers in MSC cultured with TGF-β3-loaded microspheres.

Expression of the chondrogenic markers aggrecan (ACAN), type II collagen (COL2A1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) was analysed by RT-qPCR (a-d). When compared to undifferentiated cells (MSC at day 0), MSC cultured for 21 days with unloaded microspheres (MSC+mS) did not show any induction of these markers. Expression of COL2A1, COMP and HAPLN1 was up-regulated in MSC+mS/TGF as compared to MSC at day 0 or MSC+mS, indicating differentiation into mature chondrocytes. The level of ACAN mRNA was higher in MSC+mS/TGF than in MSC+mS, confirming the differentiated phenotype in the former condition. Cells differentiated equally well when cultured without scaffold but in the presence of TGF-β3 in the medium (MSC+TGF; positive control). The hypertrophy markers type X collagen (COL10A1) and secreted phosphoprotein 1 / osteopontin (SPP1) were also induced in MSC+mS/TGF at a similar level than that in MSC+TGF (e and f).



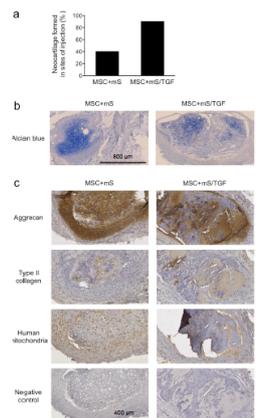
4 - Accumulation of aggrecan and type II collagen in aggregates of MSC cultured with TGF-β3-loaded microspheres

Immunohistochemistry analysis showed that there was a greater accumulation of aggrecan and type II collagen in MSC+mS/TGF and MSC+TGF as compared to MSC+mS, confirming that chondrogenic differentiation *in vitro* required the presence of TGF-β3 (a). Examination of histological sections at day 28 indicated that although cells were preferentially localized around the microspheres, they were sometimes found deep into the remnants of TGF-β3-loaded microspheres (b). The global aspect of a MSC+mS/TGF aggregate observed by stereomicroscopy after 28 days of culture is shown in c.



5 - In vivo neocartilage formation

Microspheres were mixed with MSC and injected subcutaneously into SCID mice. Twenty one days after implantation, neotissues were collected and processed for histological and immunohistochemical analyses. Neocartilage formation occurred in 90% of the sites implanted with MSC+mS/TGF, while such tissue developed only in 40% of the sites after injection with MSC+mS (a). On histological sections, differentiated tissue containing chondrocyte-like cells appeared in central regions that stained with Alcian blue, indicating the presence of glycosaminoglycans (b). Aggrecan and type II collagen were also markedly expressed in the neotissue (c). The human origin of the neocartilage was demonstrated using an antibody directed specifically against human mitochondria (c).



Conclusion

We show here the feasibility and efficacy of a novel potential cartilage engineering approach based on MSC and self-assembled collagen microspheres carrying TGF-β3. Indeed, chondrogenic differentiation *in vitro* and the formation of a tissue resembling cartilage *in vivo* was successfully induced. The interest of these collagen microspheres resides in the versatility of the simple impregnation method used for loading the differentiation factor, ease of handling and potentially rapid transfer to the clinic thanks to the nature and structure of this injectable scaffold which does not require differentiation of MSC prior to implantation.

Préservation de l'activité protéasomale au sein des îlots de Langerhans afin d'améliorer la masse fonctionnelle bêta pancréatique lors de greffe

Anne WOJTUSCISZYN (Laboratoire de Thérapie Cellulaire du Diabète, Institut de Recherche en Biothérapie, CHU St Eloi, Montpellier)

La greffe d'îlots pancréatiques est un traitement du diabète type 1 validé tant pour le patient présentant une instabilité glycémique sévère que pour le patient déjà transplanté rénal (1-3). Cette technique permet l'obtention de très bons résultats métaboliques sans les complications postopératoires de la greffe de pancréas entier. Cependant, le nombre de patients insulinoindépendants à moyen terme reste restreint (4). Trois phénomènes limitent la viabilité et la fonction des îlots greffés : 1) le stress inflammatoire lors de l'isolement à partir du pancréas; 2) le phénomène thrombotique et inflammatoire nommé IBMIR survenant lors de la greffe intra-portale (5); 3) la glucotoxicité survenant lors d'épisodes hyperglycémiques en post transplantation. Ainsi, la réduction de la masse fonctionnelle de cellules beta pancréatiques au sein des îlots greffés nécessite la transplantation d'îlots provenant de deux donneurs pour un receveur. L'amélioration du « rendement » de l'isolement des îlots puis de la greffe est donc un objectif essentiel pour développer cette thérapeutique. La recherche de traitements pharmacologiques permettant d'améliorer ce rendement semble donc essentielle.

Le système ubiquitine-protéasome, principal système de dégradation protéique au sein de la cellule, tient un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires (6). Son rôle dans la cellule bêta pancréatique est encore peu étudié. Les données sur l'apoptose et la sécrétion d'insuline par une cellule bêta dont le protéasome serait altéré sont contradictoires mais laissent entrevoir un rôle majeur du protéasome dans la masse fonctionnelle bêta-cellulaire (7). Ainsi, dans des conditions de stress oxydant ou en présence d'hlAPP, l'activité du protéasome est diminuée. Notre équipe a par ailleurs montré l'augmentation de l'apoptose lors de l'inhibition du protéasome dans des cellules bêta, effet décuplé sous haut glucose (8).

Il nous semble donc important de préciser l'activité du système ubiquitine-protéasome dans les îlots humains en conditions de stress post-greffe, i.e. en présence de cytokines pro-inflammatoires et de glucotoxicité. Nous espérons ainsi répondre à ces questions :

a) l'excès de cytokines pro-inflammatoire et/ou l'hyperglycémie sont-ils responsables d'un déficit d'activité du protéasome dans les îlots humains?

b) Quel est l'impact d'une diminution ou augmentation de l'activité du protéasome, en condition de stress cytokinique et/ou de glucotoxicité, sur la masse fonctionnelle bêta?

c) le protéasome peut-il être la cible pour un prétraitement pharmacologique des îlots humains afin d'améliorer leurs survie et fonction *in vivo* après transplantation?

Grâce à l'obtention d'îlots humains isolés dans notre laboratoire à partir de pancréas de donneurs, nous proposons de répondre à ces questions en regardant:

1) *in vitro*, le niveau d'activité protéasomale, en corrélation avec le taux d'apoptose et de sécrétion d'insuline, dans les îlots humains cultivés en présence de haut glucose et de cytokines pro-inflammatoires;

2) *in vitro*, si le traitement avec un activateur (PA28) ou un inhibiteur (MG132) du protéasome modifie la réponse cellulaire au stress cytokinique et glucotoxique;

3) *in vivo*, si un prétraitement des îlots humains par ces modulateurs du protéasome peut être bénéfique sur la masse fonctionnelle des îlots greffés chez la souris NOD/scid.

Les perspectives à moyen terme sont l'application de ces résultats pour la greffe d'îlots chez l'homme, la réduction de la masse d'îlots à infuser pour obtenir un succès clinique, et la possibilité de proposer à un plus grand nombre de patients cette voie thérapeutique innovante.

Publications :

1. Broca C, Varin E, Armanet M, Tourrel-Cuzin C, Bosco D, Dalle S, et al. Proteasome Dysfunction Mediates High Glucose-Induced Apoptosis in Rodent Beta Cells and Human Islets. Abderrahmani A, éditeur. PLoS ONE. 18 mars 2014;9(3):e92066.

2. Varin EM, Wojtuszczyz A, Broca C, Muller D, Ravier MA, Ceppo F, et al. Inhibition of the MAP3 kinase Tpl2 protects rodent and human β -cells from apoptosis and dysfunction induced by cytokines and enhances anti-inflammatory actions of exendin-4. *Cell Death Dis.* janv 2016;7(1):e2065.

Poster



Rôle du protéasome sur la masse et la fonction des îlots pancréatiques: Intérêt pour la greffe d'îlots chez les patients diabétiques de type 1.

C. Broca, E. Varin, S. Dalle, E. Renard, A. Wojtusciszyn

Laboratoire de Thérapie Cellulaire du Diabète, IRMB, CHU ST-Eloi, Av A. Fiche, 34295 Montpellier. Tel. 04 67 33 04 16. E-mail: a-wojtusciszyn@chu-montpellier.fr

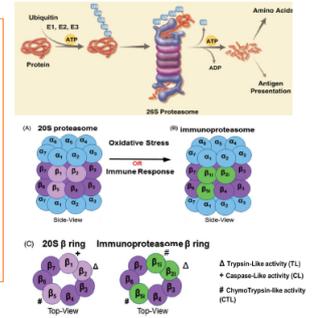


INTRODUCTION

Le système ubiquitine-protéasome (UPS), un des principaux mécanismes de dégradation des protéines, est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, apoptose, intégration des signaux externes, réponse au stress, réponse immunitaire). Mais son rôle sur la fonction sécrétrice et la survie des îlots humains est mal connu.

Par ailleurs, à côté du protéasome classique, un variant a été mis en évidence d'abord dans les cellules immunitaires, puis dans nombre de cellules stimulées par les cytokines; chez ce variant, appelé immuno-protéasome, les sous-unités catalytiques standards $\beta 1$, $\beta 2$, et $\beta 5$ sont remplacées par les sous-unités inducibles $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL-1) et $\beta 5i$ (LMP7), formant ainsi un cœur catalytique avec des sous-unités et des activités différentes (cf. schéma ci contre). L'immuno-protéasome, longtemps été restreint à la génération de peptides pour la présentation antigénique par les molécules du CMH classe I, pourrait jouer aussi un rôle dans la réponse cellulaire au stress.

Nous avons donc recherché l'impact des différents stress touchant les îlots après greffe chez les diabétiques, i.e. le stress de l'environnement glucotoxique et le stress de l'agression cytokinique, sur l'activité du protéasome/immuno-protéasome; ainsi que sur la masse et la fonction des cellules beta pancréatiques après inhibition spécifique des variants protéasomiaux. Améliorer la survie et la sécrétion d'insuline des îlots permettrait d'éviter le recours à de multiples donneurs dans le contexte de la greffe d'îlots de Langerhans.



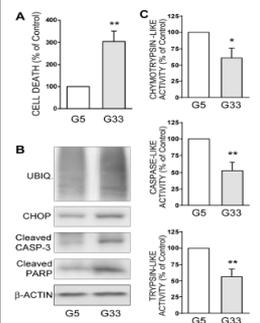
MATERIEL ET METHODES

Les expériences ont été réalisées avec des îlots humains issus de donneurs PMO, isolés dans notre laboratoire, ainsi qu'avec la lignée cellulaire bêta INS-1E. Les îlots/cellules ont été cultivés pendant plusieurs jours dans du milieu RPMI-1640, complété avec albumine, glutamine, antibiotiques, sous différentes concentrations de glucose (en mM) mimant la glucotoxicité, ainsi qu'en présence ou pas d'inhibiteurs du protéasome (MG132, Bortezomib) ou de l'immuno-protéasome (ONX-0914) ou d'un cocktail de cytokines (IL-1b, TNFa, IFNg).

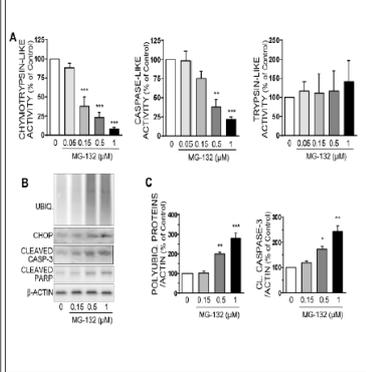
Les activités classiques du protéasome (Chymotrypsin-like, Caspase-like et Trypsin-like) et de l'immuno-protéasome ont été évaluées, de même que la sécrétion d'insuline (incubation à bas glucose puis haut glucose), et l'apoptose (détection par WesternBlot des marqueurs caspase 3 clivée et PARP clivée, fragmentation de l'ADN par kit ELISA).

RESULTATS GLUCOTOXICITE ET PROTEASOME CLASSIQUE

1 : L'exposition chronique (14 jours) des îlots humains à un haut glucose (G33mM soit 6g/L vs contrôle à G5,5mM) induit la mort cellulaire (A), l'apoptose (clivage de caspase 3 et PARP, panel A et B), réduit l'activité du protéasome classique (panel C), et accroît l'ubiquitination des protéines (panel B), n=3, Moyennes +/- SEM.

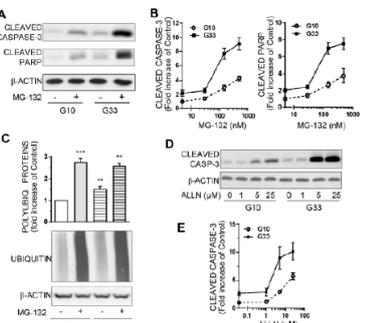


2 : Une réduction de l'activité du protéasome classique par l'inhibiteur MG132 (panel A) conduit à l'apoptose des îlots humains (panels B et C): les îlots humains ont été cultivés 48 h sous glucose normal (5,6 mM), avec ajout de l'inhibiteur du protéasome (MG-132) dans les 16 dernières heures. n=3. Moyennes +/- SEM.



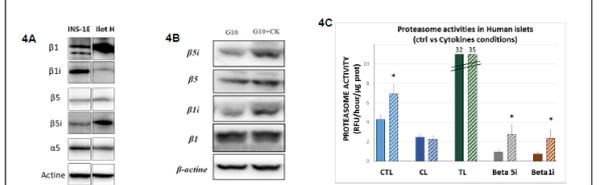
3 : Un taux élevé chronique de glucose hypersensibilise les cellules beta à l'effet pro-apoptotique des inhibiteurs du protéasome classique, utilisés dans les rejets réfractaires.

Les cellules INS-1E ont été cultivées 48h à glucose normal (10mM) ou élevé (33mM) et traitées les 16 dernières heures avec des inhibiteurs du protéasome classique (MG132, ALLN). Effets de MG132 sur les marqueurs de l'apoptose (caspase 3 et PARP clivée, panel A) et après quantification des bandes de densité (panel B). Effet de MG132 sur la quantité de protéines ubiquitinylées (C). Effet de ALLN sur le marqueur d'apoptose caspase 3 clivée (D et E). n=3, moyennes +/-SEM.



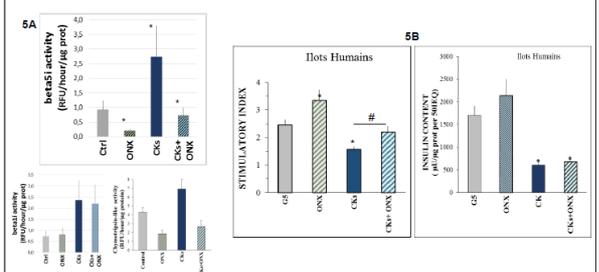
RESULTATS CYTOKINES ET IMMUNO-PROTEASOME

4. L'immuno-protéasome est présent dans les cellules beta pancréatiques humaines et il est up-régulé par un cocktail de cytokines (CK) proinflammatoires:



4A → Expression de différentes sous-unités de l'(immuno)-protéasome dans les îlots humains.
4B → Expression de différentes sous-unités de l'(immuno)-protéasome dans les cellules INS-1E stimulées par un cocktail de Cytokines.
4C → Différentes activités du protéasome mesurées dans les îlots humains en conditions basales (uni) ou sous cytokines (rayé). n=4, *p<0,05.

5. L'inhibition spécifique de la sous-unité beta5 de l'immuno-protéasome accroît l'index de stimulation de la sécrétion d'insuline des îlots humains en conditions normale et pro-inflammatoire:



5A → ONX inhibe spécifiquement (~80%) l'activité beta5 de l'immuno-protéasome en conditions basales et sous cytokines. La sous unité beta1 n'est pas inhibée, ni les autres sous unités du protéasome. En conséquence, l'activité CTL globale dans les îlots est réduite d'environ 60%.

5B → L'inhibition de beta5 améliore la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose en absence et présence des cytokines (CKs, qui exercent un effets délétère sur la sécrétion d'insuline et l'index de stimulation = ratio de sécrétion d'insuline sous haut glucose -16,7mM- vs bas glucose -2,8mM-). Le contenu cellulaire en insuline des îlots n'est pas significativement modifié. * p<0,05 vs Ct, # p<0,05 vs CKs.

CONCLUSIONS

L'hyperglycémie chronique induit une dysfonction du système ubiquitine-protéasome. Une dysfonction de l'UPS conduit à l'apoptose des cellules bêta. La toxicité de l'hyperglycémie chronique sur la cellule beta pancréatique pourrait donc être liée, au moins en partie, à un déficit d'activité du protéasome. Les inhibiteurs du protéasome, utilisés dans les rejets, auraient des effets synergiques avec l'hyperglycémie, limitant leur utilisation chez les diabétiques ou favorisant l'apparition du diabète post-greffe.

Par ailleurs, l'immuno-protéasome est présent et actif dans les cellules bêta et îlots pancréatiques humains. Indépendamment du protéasome constitutif, et via la sous-unité beta5i, l'immuno-protéasome joue un rôle délétère dans la capacité sécrétrice des cellules bêta. Le mécanisme d'action liant l'immuno-protéasome à la fonction sécrétrice reste à élucider, de même qu'un possible effet sur l'apoptose des cellules bêta. L'inhibition de l'immuno-protéasome serait alors moins délétère sur la fonction beta cellulaire et ferait préférer ce type de drogue dans le traitement des rejets.

Mieux comprendre le mécanisme des effets délétères de l'immuno-protéasome, notamment lorsqu'il est stimulé par les cytokines proinflammatoires, constitue un objectif important pour améliorer la survie des îlots après greffe chez les diabétiques de type 1 transplantés.

Facteurs immunologiques associés à la persistance du virus de l'hépatite E chez les transplantés d'organes

Eric CHAMPAGNE (Inserm ADR Midi-Pyrénées, Limousin)

Les infections par le virus de l'hépatite E sont un problème de santé émergent chez les patients transplantés d'organes sous traitement immunosuppresseur, évoluant fréquemment vers une hépatite chronique dans laquelle une altération de l'immunité cellulaire est déterminante. Des données récentes indiquent que la ribavirine utilisée comme médicament antiviral permet souvent le contrôle de l'infection par un mécanisme dans lequel une activité immunomodulatrice est suspectée. Chez certains patients ce traitement ne permet pas l'élimination du virus. Par ailleurs la cyclosporine et le tacrolimus, des immunosuppresseurs utilisés pour contrôler le rejet de greffe, semblent affecter différemment le cours de l'infection.

Objectifs : nous souhaitons identifier les composantes de l'immunité cellulaire impliquées dans la clairance virale après la phase aigüe de l'infection par HEV chez les patients immunodéprimés. Nous étudierons les mécanismes immunologiques liés à l'action de la ribavirine.

Méthodologie : Le projet s'appuie sur des une collection d'échantillons de patients suivis au niveau du Service de Transplantation du CHU de Toulouse (18 patients transplantés avec infection aigüe dont 13 évoluant vers une forme chronique, 36 transplantés contrôles et 18 patients traités par ribavirine et suivis pendant au moins 6 mois). Ils incluent des cellules sanguines (phase aigüe et phase de traitement) et des biopsies hépatiques (une centaine au total), associées à des données virologiques (charge virale). Les sous-populations lymphocytaires et leur évolution seront explorées par cytométrie en flux sur des échantillons sanguins. Les cellules de l'immunité conventionnelle (T-CD4, T-CD8) et non-conventionnelle (T- $\gamma\delta$, cellules NK et NKT, Treg) seront analysées et caractérisées pour leurs marqueurs d'activation, mémoires ou régulateurs. Les marqueurs des lymphocytes dans le foie seront analysés sur des biopsies hépatiques par immunohistochimie et/ou hybridation in situ. Nous nous efforcerons d'isoler les cellules sanguines réactives contre des antigènes viraux ou cellulaires et de préciser leur spécificité antigénique et leurs fonctions effectrices ou modulatrices par des expériences in vitro de restimulation contre des peptides viraux synthétiques ou des hépatocytes infectés. Le répertoire du TCR des lymphocytes T périphériques et celui des cellules infiltrant les lésions hépatiques sera analysé en s'appuyant sur les techniques d'immunoscope et/ou de microdissection par capture laser (LCM). Nous rechercherons particulièrement la présence de clones lymphocytaires dominants et suivrons leur évolution au cours de la maladie et du traitement.

Résultats attendus : ce travail permettra d'identifier les populations lymphocytaires (cellules conventionnelles ou non) déterminantes pour l'élimination du virus chez les patients transplantés et de préciser les effets sur ces cellules des traitements antiviraux et immunosuppresseurs mis en œuvre afin d'adapter leur utilisation.

Publication :

Abravanel F, Barragué H, Dörr G, Sauné K, Péron J-M, Alric L, et al. Conventional and innate lymphocytes response at the acute phase of HEV infection in transplanted patients. *J Infect.* juin 2016;72(6):723-30.

Amélioration de la préservation des greffons cardiaques avant transplantation par l'utilisation d'un nouveau procédé de perfusion par perfusion pulsatile hypothermique

René FERRERA (INSERM UMR 1060 – Equipe 5 Cardioprotection, Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine Lyon Est)

Problématique

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

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

Objectifs de l'étude

Notre équipe envisage de répondre aux 2 questions suivantes :

- Peut-on optimiser la protection du greffon cardiaque par l'utilisation d'une nouvelle méthode de perfusion pulsatile hypothermique associée à un soluté de conservation enrichi ?
- Les résistances vasculaires coronaires sont-elles de bons témoins de l'état de viabilité du greffon? Sont-elles bien corrélées avec d'autres indices de viabilité ? **Etapes du projet**
- Réalisation d'un nouveau prototype optimisé pour le transport et d'évaluation des greffons cardiaques.
- Ce système original associé que notre soluté de perfusion sera ensuite testé sur un modèle in vitro de cœur isolé (modèle Langendorff) avant d'être validé par des transplantations cardiaques expérimentales.

Résultats attendus

A terme, l'application de ces procédures à la clinique humaine permettrait de :

- Prolonger le temps de conservation du cœur (mais peut-être aussi des autres organes) au-delà des 4-6 heures habituelles.
- D'utiliser des cœurs prélevés non battant en optimisant leur protection grâce à la perfusion pulsatile hypothermique, tout en les évaluant en temps réel pendant le transport.

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

Brevets :

1. Ferrera R. Method for the hypothermic perfusion of a cardiac organ, and device for the implementation thereof. US8802425 B2, 2014
2. FERRERA R. Solution aqueuse de conservation d'un organe et utilisations lors de l'ischémie hypothermique. WO2015071602 A1, 2015

Poster

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Nouvelle méthode de préservation hypothermique prolongée des greffons cardiaques avant la greffe

Daniel GRINBERG^{1,2}, Lionel AUGÉUL¹, Joseph LOUFOUAT¹, Elisabeth COUTURE-LEPETIT¹, Jean-François OBADIA^{1,2}, Michel OVIZE^{1,2}, René FERRERA¹

¹ INSERM U1060 CarMeN, Equipe n°5 "Cardioprotection", Université Lyon 1, France

² Hôpital Cardiologique Louis Pradel, Hospices Civils of Lyon, BRON - France.

Etude en partie financée par l'INSERM et par l'Agence de Biomédecine

Objectifs

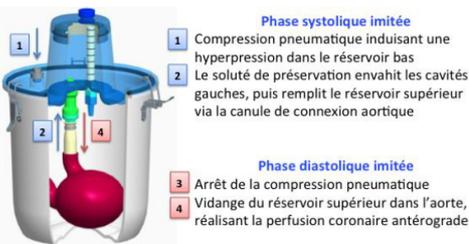
Le nombre de greffes cardiaques est stable en France depuis 10 ans, du fait de la pénurie de greffons. La défaillance primaire de greffon survenant dans 20% des cas grève la mortalité de la greffe, et est généralement liée à la préservation de l'organe. Malgré le développement des solutés de préservation et des dispositifs de préservation, la durée d'ischémie froide reste limitée à 4-6h.

Dans un modèle porcin, nous avons évalué un nouveau dispositif de préservation appelé Perfusion Physiologique Imitée (PPI).

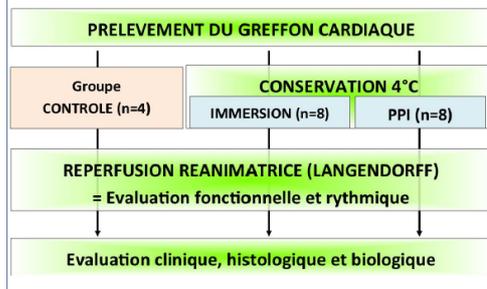
Méthodologie

Pour la première phase de notre expérimentation, le soluté extracellulaire Saint-Thomas® a été utilisé comme perfusât de préservation.

Fonctionnement du dispositif PPI:



Protocole expérimental:



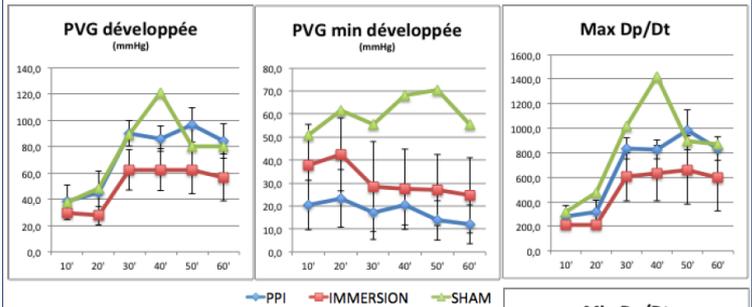
Résultats

Données sur 2 cœurs contrôles, 5 cœurs « PPI » et 6 cœurs « immersion ».

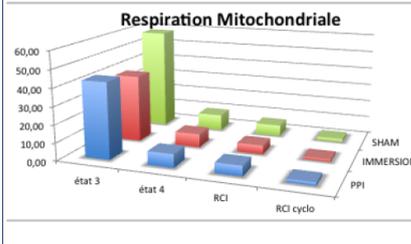
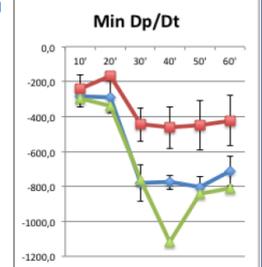
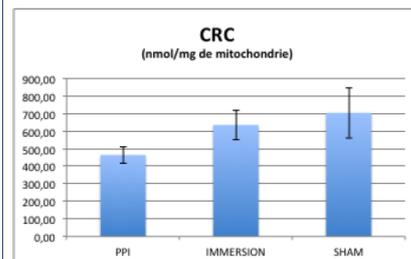
Résultats sur la préservation :

- Durée moyenne de préservation : 17h en « PPI » vs 17h50 en immersion, (pas d'incident majeur avec la PPI).
- Prise de poids : 19,42% cœurs PPI vs 0% en immersion (p=0,007).
- Acidification plus marquée du liquide de préservation dans le groupe PPI.

Résultats sur les propriétés contractiles au cours de la réanimation :



Résultats sur les fonctions mitochondriales:



Conclusion

Ces résultats indiquent le bon potentiel protecteur de ce dispositif de perfusion pulsatile. Nous débuterons prochainement une nouvelle série évaluant l'utilisation de ce dispositif associé à un perfusât optimisé de type LYPS.

Réponses fonctionnelles des Polynucléaires Neutrophiles vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus* chez les patients allogreffés de moelle osseuse

Carole ELBIM (Unité INSERM U945 « Immunité et infection », hôpital Pitié Salpêtrière)

OBJECTIFS

L'aspergillose invasive est une infection fongique profonde extrêmement grave à point de départ le plus souvent pulmonaire survenant fréquemment chez les patients immunodéprimés comme les allogreffés de moelle osseuse (AGMO) sous immunosuppresseurs. Le polynucléaire neutrophile (PN) constitue une des premières barrières de défense contre l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme. Alors que le rôle crucial du PN dans le contrôle de l'infection aspergillaire a été clairement établi, aucun travail n'a jusqu'à ce jour étudié le fonctionnement précis et détaillé des PN de patients AGMO en réponse à *Aspergillus fumigatus*, le principal agent de l'aspergillose invasive. L'objectif de ce projet est d'étudier au sein d'une cohorte de patients AGMO et suivis de façon longitudinale le comportement des PN vis-à-vis d'*A. fumigatus* à différents temps critiques de la greffe. Cette étude sera réalisée au niveau fonctionnel et protéomique. L'expression des différents récepteurs de l'immunité impliqués dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* par le PN ainsi que l'environnement cytokinique seront évalués en parallèle.

Afin d'offrir un contrôle robuste, les caractéristiques des PN du donneur (dont il est attendu qu'ils possèdent des fonctions normales) seront étudiées et comparées par la suite à celles des PN du receveur après greffe.

Les PN des receveurs seront étudiés :

- en post-greffe précoce, en sortie d'aplasie)
- à différents temps post-greffe : 2 mois, 6 mois, et 10 mois

RESULTATS ATTENDUS

Il est attendu que la fonctionnalité en pré-greffe soit normale ; et perturbée en post-greffe précoce et au cours des épisodes de GVH sous immunosuppresseurs. Cependant, chez les patients en rémission complète, il est envisageable que l'administration à long terme de traitements immunosuppresseurs, notamment la ciclosporine, puisse altérer le fonctionnement des PN, même à distance de l'arrêt du traitement.

METHODOLOGIE

1. Expression à la surface du PN des différents récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* par le PN à savoir les récepteurs de type "*Toll-like receptor*" : TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-9 ainsi que la Dectine-1. Elle sera effectuée au niveau protéique par cytométrie en flux et transcriptionnel par qPCR.

2. Exploration fonctionnelle des PN :

Elle sera réalisée de façon originale dans des conditions de sang total par cytométrie en flux afin d'éviter toute procédure d'isolement des PN susceptible de les activer. Elle comportera l'étude de 1) l'expression des molécules d'adhérence à la surface cellulaire, 2) la production de formes réactives de l'oxygène (FRO), 3) la phagocytose, 4) la survie, et 5) le niveau d'activation des voies transductionnelles mises en jeu par l'interaction des ligands aspergillaires avec leurs récepteurs (NF- κ B, MAPK, Syk)

Elle sera effectuée après stimulation par différents antigènes aspergillaires (1,3- β -D-glucan,...) mais également des ligands de TLR-1, TLR-2, TLR-4 et TLR-9.

La réponse cytokinique de l'hôte (cytokines pro- et anti-inflammatoires et réponse Th17 associée à une activation des PN) sera évaluée en parallèle dans les mêmes conditions de stimulation

3. L'approche protéomique sera réalisée par électrophorèse bidimensionnelle de type DIGE

(*differential in gel electrophoresis*) : L'analyse consistera à comparer le protéome complet des PN du donneur au protéome complet des PN du receveur 1) en sortie d'aplasie et 2) chez les receveurs en rémission complète à 10 mois de la greffe.

Comparaison de deux stratégies pour la réalisation de l'épreuve d'apnée dans le diagnostic de la mort encéphalique chez le donneur potentiel d'organes. CPAPNEE STUDY

Michel PINSARD (Service de Réanimation Chirurgicale, CHU Poitiers)

Contexte:

La législation française concernant le diagnostic clinique du décès en état de mort encéphalique (EME), exige depuis 1996, en plus de la disparition totale de la conscience et de la motricité spontanée, que la totalité des réflexes du tronc cérébral ainsi que la ventilation spontanée soient abolis. La vérification de l'absence de toute ventilation spontanée se fait à partir d'une épreuve de débranchement du ventilateur assurant jusqu'alors la ventilation du patient. La réalisation de cette épreuve fait l'objet en 1995 de recommandations établies par l'American Academy of Neurology.

Justification:

En raison de plusieurs publications rapportant des complications graves lors de la réalisation de cette épreuve d'apnée, l'Académie de Neurologie Nord-Américaine dans sa révision des guidelines concernant le diagnostic de la mort encéphalique publiée en 2010 recommande "Areas of future research include examining the safety of the apnea test, seeking alternative methods of apnea testing ». Quelques équipes ont proposé de modifier l'épreuve d'apnée en ne débranchant pas le patient du ventilateur mais en le passant sur un mode de ventilation spontanée en pression positive continue (CPAP). Ces études sont monocentriques, non contrôlées, elles ont étudiées les deux stratégies successivement sur un petit nombre de patients, ceux-ci étant leur propre témoin. Néanmoins, une étude récente cherchant à montrer l'intérêt d'une stratégie de ventilation du donneur d'organes limitant le dérecrutement pulmonaire a permis de montrer une augmentation de 27% du nombre de prélèvement de greffons pulmonaires. Dans cette étude, l'épreuve d'apnée était réalisée en CPAP. Notre étude se propose donc de comparer la stratégie actuelle de l'épreuve d'apnée à la stratégie en CPAP.

Objectif principal:

Evaluation du nombre de sujets présentant les critères gazométriques de prélevabilité pulmonaire

Objectifs secondaires:

Portent sur le degré d'hypoxémie induit par l'épreuve d'apnée ainsi que sur les complications ventilatoires et cardio-circulatoire de l'épreuve.

Critères de jugement principal:

Rapport $PaO_2 / FiO_2 > \text{ou} = 300 \text{ mmHg}$ sous une $FiO_2 < \text{ou} = 1$ lors de la proposition des greffons pour transplantation

Critères de jugement secondaires:

1- degré d'hypoxémie apprécié par la variation de PaO_2 durant l'E.A 2- Gazométries à H+1 et à H+6 de l'E.A ainsi que lors de la proposition des greffons pulmonaires 3- Fréquence des complications ventilatoires : Barotraumatismes, atélectasies pulmonaires appréciés :à partir des données d'auscultation, de la variation de la mesure de compliance réalisée avant et après l'E.A 4- Fréquence des interruptions de l'épreuve d'apnée pour mauvaise tolérance, 5- Nombre de prélèvements pulmonaires réalisés chez les patients ne présentant pas de contre-indication préalable au prélèvement pulmonaire.

Méthodologie:

Etude prospective, multicentrique, randomisée, contrôlée, ouverte

Critères d'inclusion:

Tous sujets âgés de plus de 18 ans et de moins de 70 ans présentant des signes neurologiques cliniques évocateurs d'une ischémie cérébrale majeure à l'exception de l'absence de ventilation spontanée et chez qui un prélèvement d'organes peut être envisagé.

Critères de Non inclusion:

1- Sujets présentant une hypoxémie sévère ($PaO_2 / FiO_2 < 200$) sous $FiO_2 100 \%$ en ventilation contrôlée. 2- Hypothermie $< 36^\circ C$. 3- Obésité ($BMI > \text{ou} = 40$) avec hypoventilation alvéolaire documentée. 4- Sujets présentant une hypotension réfractaire malgré un remplissage optimal et des doses de catécholamines $> 1 \text{ g.Kg.min}$. 5- Patients présentant une contre-indication d'emblée au prélèvement d'organes. 6- Patients porteurs d'une insuffisance respiratoire chronique documentée. 7- Patients présentant une pneumopathie infectieuse évolutive. 8- Patients pour lesquels la famille a

exprimé une opposition à la participation de leur proche à cette étude.9- Personnes bénéficiant d'une protection renforcée à savoir les mineurs, les femmes enceintes, qui allaitent, les personnes privées de liberté par une décision judiciaire ou administrative, les personnes séjournant dans un établissement sanitaire ou social, les majeurs sous protection légale.

Stratégies:

Stratégie actuelle: après une pré-oxygénation en O₂ pur durant 15 minutes-débranchement du ventilateur et mise sous O₂ pur durant 15 minutes recherche de mouvements ventilatoires et vérification que la capnie de fin d'épreuve soit = ou >60 mmHg.

Stratégie étudiée: après une pré-oxygénation en O₂ pur durant 15 minutes, passage en mode CPAP soit sur le ventilateur soit sur un appareil spécifique de CPAP sous FiO₂=0.75 et PEP10, durée 10 minutes, même surveillance et PCO₂ requise identique.

Nombres de patients:208 patients dont 104 dans le bras stratégie « standard » et 104 dans le bras stratégie « CPAP »

Durée de la recherche:

Durée d'inclusion: 24 mois, Durée de participation pour le patient: 1 jour, Durée totale de l'étude: 30 mois

Retombées attendues:

Amélioration du nombre de greffons pulmonaires prélevables, diminution du nombre de complications ventilatoires et cardio-vasculaires lors de l'E.A et du nombre d'E.A non réalisable ou interrompues, enfin modifications des recommandations officielles pour la réalisation de l'E.A.

Injection de cellules apoptotiques en allogreffe de cellules hématopoïétiques, du laboratoire au lit du patient

Sylvain PERRUCHE (Tolérance et Inflammation en Transplantation, Groupe SP, UMR1098 – INSERM / EFS BFC – Université de Franche-Comté)

Ce projet s'inscrit dans le développement de stratégies de thérapies cellulaires en particulier dans l'utilisation de leucocytes apoptotiques, à partir de travaux fondamentaux réalisés dans notre unité. Cette stratégie s'applique à l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (ACH) après conditionnement pré-greffe réduit. En effet, nous souhaitons développer un essai clinique d'injection de leucocytes apoptotiques chez les patients âgés éligibles pour une ACH déplétée en lymphocytes T et B après conditionnement pré-greffe allégé. Cette approche sera consolidée en parallèle dans un modèle animal préclinique d'allogreffe de moelle osseuse afin de valider que l'injection de leucocytes apoptotiques d'origine tierce partie (TP) favorise la prise d'un greffon déplété en lymphocytes T et B, que cette approche est compatible avec un conditionnement pré-greffe réduit de type irradiation corporelle totale 2 Gy associée à un traitement par fludarabine, et enfin, que l'injection de cellules apoptotiques « TP » ne réduit pas l'effet GvL de l'ACH ni ne favorise la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Le second aspect de ce projet est de comprendre le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans les mécanismes d'induction de tolérance dépendants des cellules apoptotiques. Nous avons pu montrer *in vivo* que l'injection de cellules apoptotiques induisait les pDC à favoriser une polarisation de lymphocytes T régulateurs (Treg). Le TGF- β n'est pas le seul facteur impliqué dans l'induction de Treg *in vivo* puisque le traitement des pDC par TGF- β recombinant favorise alors une polarisation lymphocytaire Th17. Nous souhaitons donc définir le/les facteurs impliqués (TSP-1, TSLP, MFGE-8...) dans cette dichotomie grâce à l'étude protéomique des surnageants de macrophages cultivés avec des cellules apoptotiques. La voie de signalisation et l'activation du TGF- β dans les pDC semblent essentielles. Nous évaluerons ces aspects à l'aide d'animaux transgéniques déficients soit en récepteur I au TGF- β soit en intégrine $\alpha V\beta 8$ (permettant l'activation du TGF- β latent), respectivement. De plus, la stimulation des pDC par CpG ODN inhibe la production de TGF- β par les pDC mais pas la phosphorylation du facteur de transcription Smad2. Ceci suggère qu'un élément de la voie de signalisation du TLR9, tel qu'IRF7, interagit avec la voie des Smad et bloque leur fixation sur la région promotrice du TGF- β . Nous allons étudier ces interactions à l'aide de techniques d'immunoprécipitation (IP) mais aussi d'IP de chromatine suivi de séquençage haut débit. Enfin, bien que la co-culture de cellules apoptotiques avec les pDC ne prévienne pas leur activation par le CpG ODN, ceci n'exclut pas ces dernières n'influencent pas directement les pDC. Ainsi les molécules de reconnaissance des cellules apoptotiques seront étudiées par RT-PCR. Ce projet s'inscrit donc dans le développement de thérapies cellulaires innovantes telles que l'injection de leucocytes apoptotiques. Une fois la faisabilité de cette approche démontrée en ACH, cette stratégie pourra être appliquée à d'autres pathologies comme décrit dans différents modèles expérimentaux (arthrite, maladie de Crohn, alloimmunisation...). De plus les travaux fondamentaux de ce projet permettront d'identifier le rôle des pDC dans les mécanismes de tolérance et l'importance du TGF- β dans cette population particulière, intermédiaire entre l'agression du système immunitaire et sa réponse.

Rôle et mécanismes immunomodulateurs des NKT invariants humains après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Olivier HERMINE (CNRS UMR 8147 « Cytokines, hématopoïèse et réponse immune », Hôpital Necker, Paris)

L'allogreffe est une thérapeutique potentiellement curative dans de nombreuses hémopathies malignes. L'amélioration des résultats de l'allogreffe repose sur un meilleur contrôle de l'effet délétère de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) tout en préservant le bénéfice de l'effet immunitaire anti tumoral du greffon (effet graft-versus-tumeur ou GVT). Les lymphocytes T natural killer invariants (iNKT) peuvent contrôler la GVH sans altérer l'effet GVT dans des modèles murins. Chez l'homme, deux sous-types de cellules iNKT à fonctionnalité distincte sont décrits, les iNKT CD4 positifs et les iNKT CD4 négatifs. Nous avons montré préalablement qu'une meilleure reconstitution en lymphocytes iNKT après allogreffe peut permettre dès J15 de prédire un risque significativement diminué de développement de GVH aigue et était un facteur indépendant significatif prédictif d'une amélioration de la survie globale post-greffe par diminution du risque de mortalité liée à la GVH aigue sans augmentation du risque de rechute. Sur la base de ces données, nous émettons l'hypothèse que les lymphocytes iNKT pourraient également moduler les effets GVH et GVT après allogreffe chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier *in vitro* puis *in vivo* dans un modèle murin humanisé de GVH/GVT, le rôle des différents sous types phénotypiques de lymphocytes iNKT (CD4+ versus CD4-) sur la réponse allogénique et les mécanismes par lesquels les iNKT humains peuvent moduler les effets GVH et GVT.

Les **résultats attendus** sont (1) la mise en évidence d'au moins un sous type iNKT (CD4+ et/ou CD4-) prépondérant dans le contrôle de la réponse allogénique (réaction mixte lymphocytaire *in vitro* et GVH *in vivo*), (2) la détermination d'un ratio régulateur/effecteurs optimal *in vitro* pour application *in vivo*, (3) l'élucidation des mécanismes d'action et leur potentielles interactions avec d'autres effecteurs immunologiques de la réponse allogénique : cellules présentatrices d'antigène (CPA) et lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+ (T regs) (4) l'optimisation de leur efficacité en recherchant le moment le plus opportun de leur administration après l'allogreffe *in vivo* (enrichissement du greffon et/ou injections différées)

Les résultats obtenus devraient conduire à la proposition de nouvelles approches de thérapie cellulaire chez les patients allogreffés permettant de moduler les effets GVH et GVT.

Les **méthodes** utilisées pour les études *in vitro* des iNKT reposeront sur l'utilisation de cellules obtenues à partir de donneurs sains et mises en co-culture dans différentes situations permettant d'étudier l'effet des iNKT sur la stimulation de lymphocytes T allogéniques via des CPA avec ou sans T regs. Le modèle murin de GVH humanisée sera développé au laboratoire selon des modèles décrits. Les sous types de lymphocytes iNKT seront injectés dans ce modèle pré-clinique en combinaison avec une greffe de cellules mononuclées humaines (effet GVH) avec ou sans cellules leucémiques (effet GVT).

Amélioration technique de l'expansion ex vivo des cellules hématopoïétiques de sang placentaire de grade clinique (utilisée pour le protocole de recherche clinique «GRAPA»)

Zoran IVANOVIC (Laboratoire R&D en Ingénierie Cellulaire de l'Etablissement Français du Sang – Aquitaine Limousin)

Dans le laboratoire R&D en Ingénierie Cellulaire de l'EFSAL, nous avons développé une procédure d'expansion ex vivo à partir des cellules CD34 de sang placentaire congelé. Ce système mis en grand volume s'avère très efficace (amplification cellulaire de 400 fois, amplification des cellules CD34+ de 60 fois et des progéniteurs engagés de 150 fois, sans perte de la capacité de greffe à court et à long terme des cellules souches. Cette technique développée à l'échelle clinique par notre laboratoire de thérapie cellulaire représente la base d'un PHRC nommé « GRAPA » qui consiste à greffer des patients adultes atteints de pathologies myélo-prolifératives en contexte allogénique (investigateur principal professeur Noël Milpied). Les résultats obtenus avec les 7 premiers patients sont très encourageants et démontrent avec un recul de presque 2 ans une reconstitution rapide et durable de l'hématopoïèse après la greffe.

Encouragés par ces résultats, nous avons envisagé la possibilité d'utiliser des Unités de Sang Placentaire (USP) rejetées à cause de leur richesse cellulaire insuffisante pour la greffe. Notre objectif est d'améliorer encore l'efficacité de notre procédure d'expansion pour qu'une USP insuffisante aujourd'hui puisse devenir un greffon valide. De même, une USP riche pourra être utilisée après son expansion ex vivo pour greffer deux patients. Pour arriver à ce but, nous proposons de compléter notre culture par deux facteurs potentiellement synergiques en termes d'amplification des progéniteurs engagés et des cellules souches :

1. Ajouter au « cocktail » une cytokine (IL-6) dont l'effet positif devrait être déclenché par notre culture qui imite l'hypoxie par plusieurs aspects
2. Ajouter du TEPA, un chélateur du cuivre, qui pourrait compléter les propriétés antioxydatives de notre milieu HP01.

Ce choix est en ligne directe avec l'idée qui nous a déjà permis de réaliser une procédure d'expansion ex vivo efficace : compensation d'une hyperoxygénation due à la culture à 20-21% d'O₂ pour faciliter l'auto- renouvellement des cellules souches (notre concept « oxygen stem cell paradigm »)

Une série d'expériences pour examiner ces 3 conditions + 1 témoin (culture actuelle) est envisagée sur 7 USP au moins. De plus, en parallèle avec une culture de durée « standard » (12 jours), une culture de durée prolongée (21 jours) sera testée pour toutes les conditions.

Les effets seront suivis au niveau des progéniteurs (cultures en méthyl-cellulose) et au niveau de 2 populations de cellules souches à court et long terme par greffe dite « primaire » et « secondaire » à des souris NOG/Scid, la».)

La (les) condition(s) les plus prometteuse(s) seront transférées au grade clinique.

Publication :

Duchez P, Rodriguez L, Chevalyere J, Lapostolle V, Vlaski M, Brunet de la Grange P, et al. Interleukin-6 enhances the activity of in vivo long-term reconstituting hematopoietic stem cells in "hypoxic-like" expansion cultures ex vivo. Transfusion. 1 mai 2015;55(11):2684-91.

Poster



L'IL-6 augmente les capacités de reconstitution à long terme des cellules souches hématopoïétiques dans des cultures d'expansion ex-vivo conçues pour induire une réponse "similaire à l'hypoxie".

Pascale Duchez,^{1,2} Laura Rodriguez,^{1,2} Jean Chevalere,^{1,2} Veronique Conrad,^{1,2} Marija Vlaski,^{1,2} Philippe Brunet de la Grange,^{1,2} Zoran Ivanovic^{1,2}

1 Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Bordeaux, France;
2 UMR 5164 CNRS/Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Introduction :

Nous utilisons un milieu HRMC (Hypoxic Response Mimicking Cultures), milieu sans sérum, sans produit animal, avec anti-oxydant, supplémenté en cytokines stabilisatrices de HIF-1 α et permettant l'autorenouvellement et l'engagement des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Puisque l'IL-6 agit en synergie avec la concentration physiologique en O₂ (1%) pour maintenir les populations de CSH primitives, nous avons émis l'hypothèse que son ajout aux cultures HRMC produirait le même effet, même à la concentration atmosphérique de 20% d'oxygène.

Methodes :

Les cellules en HRMC ont été exposées à 20% et 5% d'O₂ avec et sans IL-6. Le nombre des progéniteurs engagés (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix, and CFU-Mk) a été évalué ainsi que la capacité de repopulation hématopoïétique des CSH à court et à long terme en utilisant le modèle de souris NSG in vivo (greffes primaires et secondaires successivement).

Résultats :

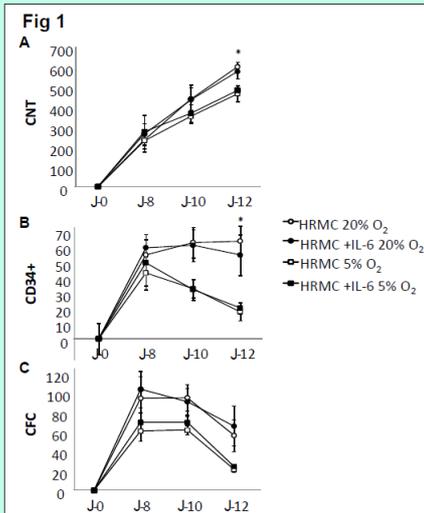


Fig. 1. Cinétique d'amplification des Cellules Nucléées Totales (CNT), des cellules CD34+ et des progéniteurs engagés (CFC) dans les cultures HRMC en fonction de la concentration en oxygène et la présence d'IL-6. HRMC = "Hypoxic Response Mimicking Culture"; "J-0, J8..." = "Jour-0, Jour-8..."; N= X-Y; * p<0.05 (Mann-Whitney test); N= 5 à 9 expériences indépendantes.

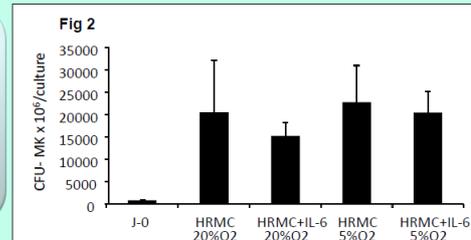
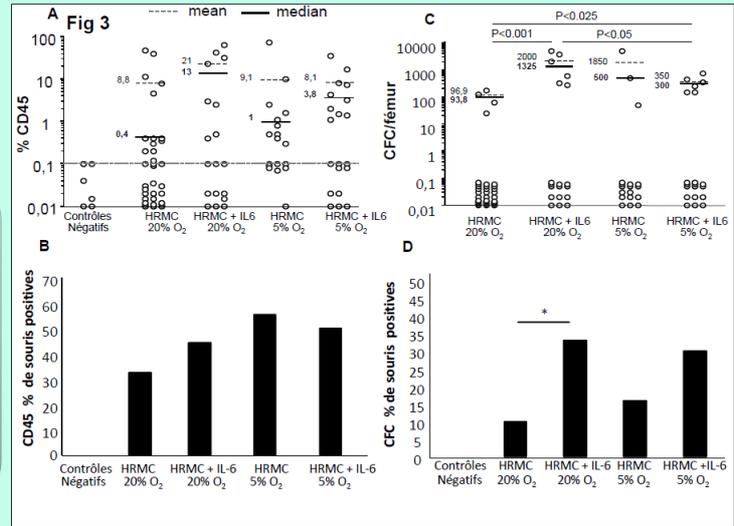


Fig. 2. Progéniteurs mégacaryocytaires dans les cultures HRMC selon la concentration en oxygène et la présence d'IL-6 : Nombre total de CFU-Mk par culture.

Fig. 3. La repopulation à long terme des cellules souches hématopoïétiques en culture à 10 jours est estimée sur la prise de greffe des cellules humaines dans la moelle des souris receveuses secondaires 8 semaines après la greffe (16 semaines après l'injection des souris primaires receveuses). A. Le chimérisme : pourcentage de cellules humaines CD45+ dans la moelle des souris. Chaque point représente une souris. La ligne en pointillée représente la limite de positivité (établie sur la base des souris qui sont conditionnées mais n'ont pas reçu de cellules le jour de l'injection). B. Fréquences de souris positives pour le CD45 humain. C. La totalité des progéniteurs hématopoïétiques humains engagés par femur i.e. Colony-Forming Cells (CFU-GM=BFU-E+CFU-Mix). *p<0.05, **p<0.001; La différence entre les valeurs est testée par le test de Mann-Whitney (seules les souris "positives" sont prises en considération). Chaque point représente une souris. D. La fréquence des souris "positives" pour les CFC d'origine humaine. Les significativités sont recherchées par le test χ^2 .



L'ajout d'IL-6 aux cultures HRMC exposées à 20% d'O₂ n'a eu d'impact significatif ni sur les progéniteurs engagés ni sur la capacité de repopulation à court terme in vivo (les résultats de la greffe "primaire" des souris ne sont pas montrés). En revanche la présence d'IL-6 a amélioré à la fois la fréquence et la capacité proliférative individuelle des populations les plus primitives mises en évidence par la production de progéniteurs engagés d'origine humaine dans la moelle osseuse des souris de seconde génération.

Conclusion :

Il est possible d'améliorer encore notre procédure d'expansion basée sur les cultures HRMC exposées à une concentration atmosphérique en O₂ simplement par l'ajout d'IL-6 au cocktail de cytokines afin d'améliorer le maintien des CSH les plus primitives sans impact négatif sur la population CSH moins primitives et les progéniteurs engagés.

Rôle des sphingolipides et de MMP-2 dans le développement du rejet chronique vasculaire médié par l'alloréaction humorale

Nathalie AUGÉ (INSERM, équipe « athérosclérose et artériosclérose de greffe », CHU Rangueil, Toulouse)

La vasculopathie de transplantation (VT) ou rejet chronique vasculaire (RCV) représente la principale cause de perte du greffon à long terme. C'est une cause de mortalité majeure chez les patients transplantés. La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) dans l'intima est impliquée dans le mécanisme de la VT, car elle induit progressivement une occlusion du vaisseau, aboutissant à une ischémie et à la perte du greffon. Il n'existe pas d'approches thérapeutiques permettant de limiter efficacement la prolifération des CMLs. L'immunité humorale jouerait un rôle important dans le développement de la VT, en particulier les anticorps anti HLA, car ils stimulent in vitro la migration et la prolifération des CMLs. Nos travaux récents montrent que les anticorps anti HLA stimulent une voie mitogène de stress qui active la migration et la prolifération des CMLs, et implique des enzymes du métabolisme des sphingolipides (sphingomyélinase neutre de type 2 ou nSMase2) et les métalloprotéases MMP-2 et MT1-MMP. Les inhibiteurs pharmacologiques de MMPs ou de nSMase2 inhibent de façon significative le développement de la VT dans un modèle animal de xénogreffe développé chez la souris SCID/beige greffée avec des artères mésentériques humaines et injectée avec des anticorps anti HLA.

Objectifs et hypothèse de travail

La nSMase2 est la première étape de la voie des sphingolipides car elle hydrolyse la sphingomyéline et libère du céramide, ensuite métabolisé en sphingosine, puis en sphingosine 1phosphate (S1P), un facteur de prolifération et de survie cellulaire. Notre hypothèse est que la migration et la prolifération des CMLs sous l'effet des anticorps anti HLA dépend de la génération de S1P. Les sphingolipides pourraient par ailleurs réguler l'expression de MMP-2 dans la matrice extracellulaire, ce qui conditionnerait la migration et la prolifération cellulaire.

Résultats attendus

- La S1P devrait être impliquée dans la prolifération des CMLs induites par les anticorps anti HLA. Les voies impliquées dans la génération de S1P (voie MMP/nSMase2, facteurs de croissance, stress oxydant), seront étudiés, de même que les récepteurs de S1P concernés, et les agents pharmacologiques permettant d'inhiber sélectivement cette voie
- Les sphingolipides réguleraient l'expression de MMP2 et de ses modulateurs (TIMPS, RECK, CD147), sous l'effet d'agents de stress, ce qui conditionnerait la prolifération des CMLs. L'effet mitogène des anticorps anti HLA devraient impliquer une uprégulation de l'expression de MMP2 et une inhibition de ses modulateurs, via les sphingolipides.

Méthodologie

Ce projet utilise des approches in vitro sur CMLs humaines et in vivo un modèle animal de xénogreffe réalisé chez les souris SCID/beige immunodéficientes, qui permet de tester des agents pharmacologiques anti RCV.

Publication :

1. Trayssac M, Galvani S, Augé N, Sabbadini R, Calise D, Mucher E, et al. Role of Sphingosine-1-Phosphate in Transplant Vasculopathy Evoked by Anti-HLA Antibody. *American Journal of Transplantation*. 1 avr 2015;15(8):2050-61.

Poster



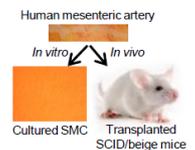
ROLE OF S1P IN ANTIBODY-INDUCED TRANSPLANT VASCULOPATHY

Trayssac M¹, Galvani S¹, Auge N¹, Calise D², Mucher E¹, Sabbadini R³, Sallusto F⁴, Thomsen M¹, Salvayre R¹, Nègre-Salvayre A¹

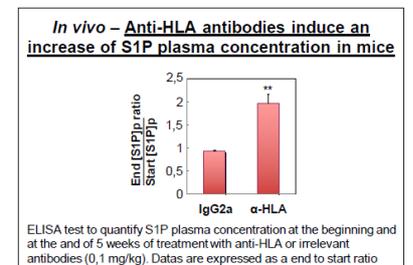
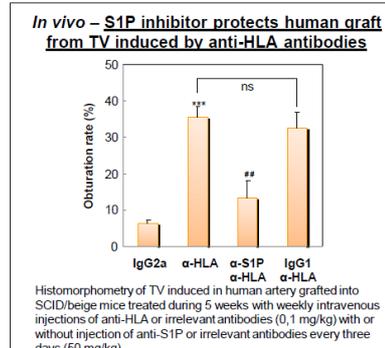
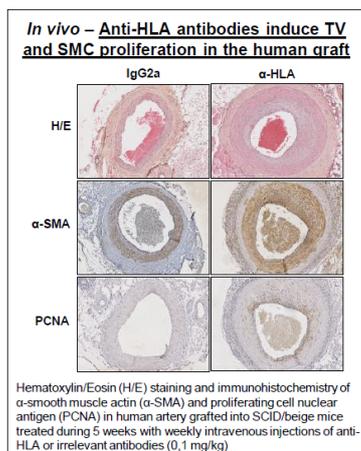
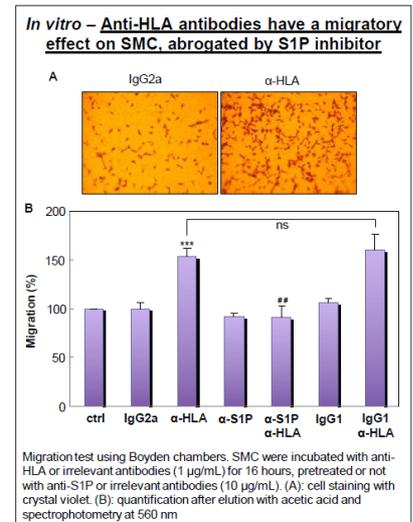
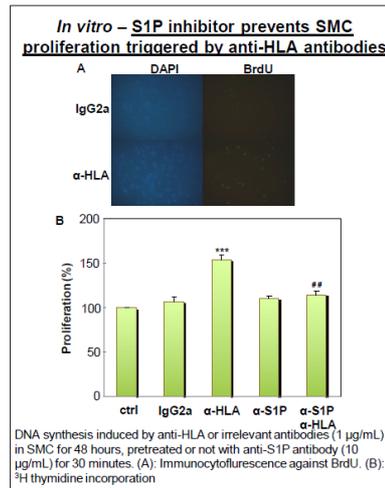
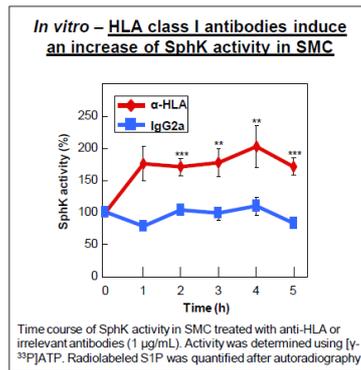
¹ INSERM/ UPS UMR U1048 / I2MC -Team "Atherosclerosis-Graft Arteriosclerosis", ² Experimental Microsurgery, IFR150 Rangueil, ³ Lpath Inc., San Diego, California, United States of America, ⁴ Department of Multiorgan Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France

Introduction – Chronic rejection is the major long-term complication for transplant patients. This pathology is characterized by transplant vasculopathy (TV) implying proliferation and migration of smooth muscle cells (SMC) in the vascular network of the grafted organ. Humoral response of the recipient directed against HLA class I molecules of the donor plays a role in the pathogenesis of TV (1). Recently, we showed that TV triggered by anti-HLA antibodies involves the sphingolipid pathway (2). The objective of this present work is to investigate the role of a bioactive sphingolipid: sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is synthesized by sphingosine kinases (SphK) and is well-known to own proliferative and migratory properties but its involvement in antibody-induced TV remains still undiscovered.

Methods – *In vitro*, we used human mesenteric SMC stimulated with anti-HLA or IgG2a irrelevant antibodies, pre-treated or not with anti-S1P antibodies (Sphingomab, LT 1002) or irrelevant IgG1 antibodies. SMC proliferation was quantified by 3H thymidine and BrdU incorporation. SMC migration was measured by Boyden's chamber assay. *In vivo*, we used xenotransplantation model of human mesenteric artery into immunodeficient SCID/beige mice at the infra-renal aortic position. After 5 weeks of treatment with weekly intravenous injections of anti-HLA or IgG2a irrelevant and co-administration with anti-S1P or IgG1 irrelevant every three days, we carried out histological studies of the human graft. We performed ELISA test to quantify S1P plasmatic concentration.



Results



Conclusion - The reported data show that, *in vitro*, anti-HLA antibodies induce S1P synthesis through an increase of SphK activity in SMC. S1P takes part in proliferative and migratory effects of anti-HLA antibodies on SMC. Furthermore, *in vivo*, HLA class I antibodies trigger TV and SMC proliferation in the human graft and an increase of S1P plasma concentration. Treatment with S1P inhibitor prevents the graft from TV induced by anti-HLA antibodies. These results highlight a crucial role for S1P in TV elicited by humoral immune response and may help for the future direction for anti-rejection therapy.

Etude pharmacocinétique du Busulfan dans le conditionnement d'une greffe allogénique chez des patients à haut risque porteurs d'hémopathies

Jean EL-CHEIKH (Institut Paoli Calmettes, Marseille)

Le conditionnement (CDT) représente une phase importante de la greffe allogénique. Nous avons contribué à établir les conditionnements à intensité réduite (RIC) et nous avons notamment allogreffé 535 patients avec ce type de stratégie à travers des essais thérapeutiques successifs. Dans notre dernière étude prospective randomisée, nous avons établi que les formes les plus atténuées de CDT de type Fluda/TBI étaient associées à un taux de rechute supérieur par rapport à un RIC de type Fluda/Bu/Sal (FBS) (HR= 2.49 (1.45-4.29)) (Manuscrit soumis). Bien que non différentes par rapport à l'autre bras, ce qui démontre le bon profil de tolérance de cette approche, les incidences de GVH chronique et de mortalité toxique (NRM) restent cependant trop élevées. Dans cette perspective, l'étude rétrospective monocentrique récente de 229 patients montre que l'augmentation de la dose de SAL de 1 à 2 jours s'accompagne d'une diminution significative des GVHA et GVHC extensive (HR=0.27 (0.12-0.59) et 0.24 (0.12-0.46) respectivement) sans impact négatif notable sur le contrôle de la maladie (manuscrit soumis).

Dans ces conditions, alors que la diminution de la NRM a été majeure, le contrôle tumoral reste le problème résiduel notamment pour les d'hémopathies malignes à haut risque. Revisiter l'intensité du CDT est une voie d'intérêt, l'enjeu étant de conserver le profil favorable de faible mortalité toxique. A partir de données locales récentes d'une cohorte de 106 patients âgés ≥ 55 ans greffés à partir de donneur HLA identique familial ou non, pour des Hémopathies Myéloïdes (52 patients) et Lymphoïdes (54 patients) après un conditionnement de type F5BX2S2 (Fludarabine (30mg/m²/j x 5), Busulfan IV (130 mg/m²/ x2) et Thymoglobuline (2.5mg/Kg/j x2)), les probabilités de PFS et NRM observées à un an sont respectivement de 60% (IC95%=[50-70]) et de 20% (IC95%=[0-28]). Pour les patients ≥ 55 ans et < 64 ans (groupe1 81 patients) et les patients ≥ 65 ans (groupe2 25 patients) on a constaté aucune différence significative concernant la survie globale (OS) et la survie sans progression (PFS) à 1 et 2 ans respectivement dans les deux groupes. Ces résultats prometteurs en termes de toxicité dans une population jusque-là contre-indiquée à la greffe en raison des risques potentiels montrent que le contrôle de la maladie à long terme est devenu le principal axe de travail dans ce domaine. Concernant le contrôle de la maladie nous avons conduit une étude rétrospective à Marseille et Nantes : 166 patients (âge médian, 57 ans) atteints de maladies myéloïdes ont été traités avec fludarabine (5jours), busulfan IV (BX ou busilvex) (2 à 4j) et SAL (2j), dont 106 avec 2 jours de Busilvex. 39 de ces patients avaient une leucémie aigüe myéloïde (LAM) en première rémission complète (RC1), sans anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (groupe à risque standard) tandis que 67 patients ont été traités pour myelodysplasie, LAM au-delà de la RC1 ou LAM en RC1 mais avec une cytogénétique de mauvais pronostic (groupe à haut risque).

La PFS à 2 ans était 60% (40-76) et 46% (32-58), dans les deux groupes respectivement.

Bien que les résultats obtenus chez les patients considérés à haut risque se comparent favorablement à ceux rapportés après un conditionnement myeloablatif standard (MAC) ou un conditionnement moins intensif, ils ne sont pas totalement satisfaisants en raison d'un taux élevé de rechute.

Ainsi, bien que la sécurité de la procédure allogénique ait été largement améliorée, affiner l'intensité du conditionnement reste bien une question importante à explorer, l'objectif étant tout en maintenant le profil de toxicité favorable, d'améliorer le contrôle à long terme des maladies.

Un récent rapport confirme que des doses plus élevées de busilvex peuvent être administrées en toute sécurité aux patients âgés ≥ 55 ans notamment en adaptant les doses à la pharmacocinétique. Dans cette perspective nous proposons une étude prospective étudiant l'intérêt de l'intensification du F5BX4S2 par adaptation pharmacocinétique de la dose de busulfan iv. La population cible consistera en des patients porteurs d'hémopathies dont le mauvais pronostic justifiera l'alourdissement du conditionnement. Les donneurs seront des donneurs HLA identiques familiaux ou non. Tous les patients âgés de ≥ 55 ans porteurs d'hémopathies malignes de mauvais pronostic candidats à une greffe allogénique seront inclus dans cette étude, en gardant une association

identique avec Fludarabine et Thymoglobuline. Un effectif de 40 patients est jugé suffisant pour estimer un taux de PFS 60% et diminuer la NRM à 1 an à 20%.

Publications :

1. Mohty M, Malard F, Blaise D, Milpied N, Furst S, Tabrizi R, et al. Reduced-toxicity conditioning with fludarabine, once-daily intravenous busulfan, and antithymocyte globulins prior to allogeneic stem cell transplantation: Results of a multicenter prospective phase 2 trial: Reduced-Toxicity Conditioning Allo-SCT. *Cancer*. 15 févr 2015;121(4):562-9.

2. Oudin C, Chevallier P, Furst S, Guillaume T, Cheikh JE, Delaunay J, et al. Reduced-toxicity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation improves outcome in patients with myeloid malignancies. *Haematologica*. 1 nov 2014;99(11):1762-8.

Rejet humoral infraclinique en transplantation cardiaque : incidence et relation avec la maladie vasculaire du greffon

Patrick BRUNEVAL (Service d'Anatomie Pathologique. Hôpital Européen Georges Pompidou)

Le rejet humoral est apparu ces dernières années comme le principal enjeu en transplantation d'organe solide. Jusqu'à récemment, la définition du rejet humoral en transplantation cardiaque requérait une association de critères clinique (dysfonction cardiaque), anatomopathologiques (inflammation microvasculaire et déposition tissulaire de complément) et biologique (anticorps antiHLA spécifiques du donneur [DSA] dans le sérum). Une telle définition ne rendait pas compte de la totalité du spectre de l'humoralité en transplantation cardiaque. En particulier, l'expérience croissante des équipes a permis d'identifier une situation anatomoclinique particulière, **le rejet humoral infraclinique**, défini par l'absence de toute dysfonction cardiaque. La reconnaissance de cette entité repose sur des paramètres qui restent à valider, en particulier sur l'analyse des biopsies endomyocardiques (BEM). Les données acquises très récemment restent parcellaires, parfois contradictoires, suggérant cependant qu'il s'agit d'une entité clinique d'intérêt pronostique, notamment en terme de maladie vasculaire du greffon (MVG). Une meilleure connaissance du rejet humoral infraclinique pourrait avoir des conséquences importantes pour la prise en charge des patients transplantés cardiaques.

Objectif: Ce projet est centré sur l'étude du **rejet humoral infraclinique** en transplantation cardiaque. Nos principaux objectifs sont d'affiner les critères de diagnostic du rejet humoral sur BEM, de déterminer l'incidence du rejet humoral infraclinique, d'en définir les caractéristiques évolutives et d'étudier son pronostic, en particulier sa relation avec la maladie vasculaire du greffon.

Méthodologie: Il s'agit d'une étude rétrospective bicentrique (La Pitié et HEGP) incluant l'ensemble des 320 transplantations cardiaques réalisées entre le 01/01/2004 et le 31/12/2007. Les informations cliniques relatives à la greffe et au suivi post-transplantation seront recueillies pour chaque bilan annuel : traitement, échocardiographie, scintigraphie myocardique, cathétérisme cardiaque, coronarographie et échographie endocoronaire. La MVG sera gradée selon la dernière classification ISHLT 2010. Un total de 5000 BEM ont été réalisées au cours du suivi de ces patients. Environ 1500 BEM seront relues, sélectionnées selon un double protocole d'inclusion : longitudinal couvrant toute la durée de la greffe et centré sur les BEM ayant présentées des épisodes de rejet cellulaire. Environ 3000 immunomarquages (C3d, C4d et CD68) seront réalisés. La recherche de DSA par technique sensible (Luminex) sera réalisée sur les sérums pré-greffe et après 1 an de greffe (N= 600) et aussi à la période correspondant à une biopsie AMR+. Une étude statistique aura pour principaux objectifs de rechercher une relation entre rejet humoral infraclinique et progression vers la MGv et d'établir une stratification du risque de développer un rejet humoral infraclinique en fonction du taux de DSA prégreffe.

Résultats attendus : 20 à 40% des transplantés cardiaques de notre série devraient présenter un rejet humoral infraclinique au cours de l'évolution de la greffe. Notre étude devrait confirmer la nature fluctuante et indolente du processus humoral chez ces patients, conduisant à une progression accélérée de la MVG. Ce travail permettra ainsi d'approcher une **histoire naturelle du rejet humoral** en transplantation cardiaque. Une meilleure connaissance du rejet humoral infraclinique permettra de juger de la pertinence de futures études de dépistage, de stratification du risque et d'évaluation d'une thérapeutique spécifique.

Poster

Rejet humoral infraclinique en transplantation cardiaque : incidence et relation avec la maladie vasculaire du greffon

MC Bories⁽¹⁾, P Bruneval⁽¹⁾, P Rouvier⁽²⁾, P Leprince⁽²⁾, S Varnous⁽²⁾, A Loupy⁽¹⁾, JP Duong⁽¹⁾

⁽¹⁾ PARCC, INSERM U970 , Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁽³⁾ Chirurgie cardiaque, Réanimation Chirurgicale et Anatomie Pathologique, La Pitie, Paris, France

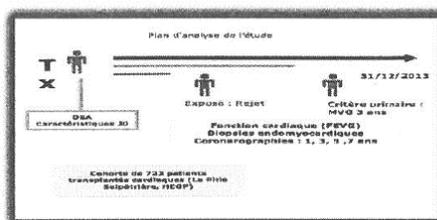
Contexte : Le rejet humoral en transplantation cardiaque était défini par l'association de critères cliniques (dysfonction du greffon), anatomopathologiques avec inflammation de la microcirculation et dépôts tissulaires de complément, et biologiques (présence d'anticorps anti-HLA sériques). L'expérience internationale a permis aujourd'hui d'identifier une situation particulière, le rejet humoral infraclinique, dépourvu de dysfonction d'organe. La reconnaissance de cette entité repose sur des paramètres histologiques qui nécessitent une validation en population. De plus, ce facteur pourrait constituer une entité pronostique, en terme de survie mais également en terme de maladie vasculaire du greffon.

Objectifs :

- Déterminer l'incidence et la récurrence du rejet humoral dans une cohorte de transplantés cardiaques consécutifs
- Identifier une association entre survenue d'un rejet infraclinique et la MVG.

Méthodes :

Etude rétrospective bicentrique de 723 transplantés cardiaques consécutifs (La Pitié Salpêtrière et HEGP, Paris) 2004-2011:



Résultats :

Incidence du rejet humoral et cellulaire : Parmi les 12792 BEM évaluées, 1085 avaient un rejet significatif, soit cellulaire ($\geq 1B/1R$), soit humoral ($\geq pAMR1+$ ou $H+$) représentant 8,5% des BEM.

346 BEM avaient un rejet humoral, soit 2,7% de rejet humoral dans la cohorte de BEM concernant 152 patients durant la totalité du suivi, soit 21% de la cohorte de patients.

809 BEM avaient un rejet cellulaire, soit 6,3% de rejet cellulaire dans la cohorte de BEM concernant 319 patients (44,1%).

Incidence de la maladie vasculaire du greffon (MVG) : A trois ans de suivi, 362 patients étaient encore vivants : parmi eux 103 patients avaient une MVG \geq grade 1 selon les critères de l'ISHLT 2010, soit 31,4% de la cohorte. En prenant le suivi total (à la date de recueil des données le 01/07/2015) de ces patients, 156 patients avaient une MVG \geq grade 1 dans leur suivi, soit 33,6% des patients.

Association entre rejet humoral à 1 an et maladie vasculaire du greffon à 3 ans de la greffe : Le rejet humoral dans la première année était un facteur de risque fort de développer une MVG : OR = 2,73. De même pour les DSA pré-greffe avec un OR = 2,43.

Analyses de survie : La survenue du rejet humoral analysé dans le suivi post-transplantation (sans limite de temps) était associée à une mortalité plus importante [courbe de survie de Kaplan Meier (test du log rank, $p=00013$)].

Conclusions et perspectives :

La cohorte constituée pour cette étude incluant plus de 700 patients transplantés cardiaques est la plus importante jamais analysée pour déterminer l'incidence du rejet humoral et son association à la maladie vasculaire du greffon.

Outre la détermination de l'incidence du rejet humoral, l'analyse des paramètres de cette cohorte unique a permis de conclure à deux faits importants :

* la survenue du rejet humoral est associée, lorsqu'il survient dans la première année, à la présence de MVG à 3 ans et à plus long terme. Ainsi, parmi les causes et mécanismes de la MVG, l'origine immunologique est donc démontrée et est un facteur puissant. Cependant d'autres facteurs de risque cardiovasculaires classiques comme le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, l'âge (du donneur) ont aussi un impact significatif.

* la survenue du rejet humoral est associée à une mortalité prématurée des greffés cardiaques, alors que dans 87% des cas le premier épisode est infraclinique (FEVG préservée).

Perspectives : La richesse des données accumulées dans cette étude est loin d'avoir été extensivement exploitée et va au-delà du rejet humoral : la fonction rénale, la fonction hépatique, l'assistance ventriculaire de courte ou longue durée, l'inscription en super urgence... sont des paramètres dont il serait intéressant d'analyser l'impact sur la MVG.

Rôle anti-leucémique des cellules Natural Killer médié par les KIR activateurs

Christelle RETIERE (Laboratoire de Recherche EA 4271 « Immunovirologie et Polymorphisme Génétique », EFS-Pays de la Loire)

L'implication des cellules Natural Killer (NK) alloréactives a été démontrée dans l'éradication des cellules leucémiques après greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), permettant de favoriser le pronostic clinique du receveur. Les fonctions cellulaires NK sont régulées par une balance de signaux inhibiteurs et activateurs qui impliquent de nombreux récepteurs dont les KIR, une famille de 14 gènes qui codent pour des récepteurs inhibiteurs et activateurs spécifiques des molécules HLA. C'est principalement l'alloréactivité cellulaire NK médiée par les KIR inhibiteurs qui a été étudiée dans la littérature. Cependant, les investigations sur les KIR activateurs dans le contexte de la greffe de CSH ont été menées principalement sur un plan immunogénétique. Notre objectif est donc de contribuer à une meilleure connaissance du rôle des principaux KIR activateurs dans le rôle anti-leucémique des cellules NK. Nous avons en effet contribué ces dernières années à une meilleure connaissance des ligands des KIR activateurs et mieux défini les règles d'alloréactivité qui régissent leur fonctionnement dépendant de l'environnement HLA en termes de ligands KIR. A notre connaissance, le rôle de ces KIR activateurs dans la fonction antileucémique des cellules NK n'a pas été étudié.

Notre objectif est d'étudier les fonctions cellulaires NK médiées par les principaux KIR activateurs caractérisés vis-à-vis de différentes cellules leucémiques *in vitro* par cytométrie de flux 4 couleurs, et *ex vivo* dans le contexte de la greffe de CSH.

Ce travail s'effectuera au sein de notre équipe de recherche (EFSPL, EA4271) en collaboration avec les services d'hématologie du CHU de Nantes qui contribueront à nous fournir différents types de cellules leucémiques caractérisées et diagnostiquer précisément la pathologie du patient. Parallèlement à cette étude mécanistique, nous étudierons l'impact des KIR activateurs sur la rechute dans le contexte de la greffe de CSH en fonction de la nature de la leucémie. Cette étude basée sur les analyses biostatistiques sera réalisée à partir des données obtenues dans le cadre d'une étude rétrospective nationale de greffes allogéniques de CSH réalisée à partir de 254 couples donneur/receveur. Cette étude avait fait l'objet d'une publication supervisée par notre équipe (K. Gagne, BBMT 2009). Nous souhaitons ainsi revisiter les données génotypiques KIR et HLA et évaluer l'impact des KIR activateurs sur le rôle anti-leucémique. Les laboratoires participants, l'Agence de la Biomédecine ainsi que le SFGM-TC ont donné leur accord pour que ces données puissent être ré-évaluées dans cet objectif. Cette étude statistique sera menée par la société Methodomics avec laquelle nous avons précédemment collaboré. Cette étude dans son ensemble doit nous permettre de mieux évaluer l'impact anti-leucémique des KIR activateurs exprimés chez le donneur dans le contexte de la greffe de CSH au regard de la nature de la leucémie.

Publications :

1. David G, Djaoud Z, Willem C, Legrand N, Rettman P, Gagne K, et al. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *The Journal of Immunology*. 1 nov 2013;191(9):4778-88.
2. Djaoud Z, David G, Bressollette C, Willem C, Rettman P, Gagne K, et al. Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 1 sept 2013;191(5):2708-16.
3. Rettman P, Willem C, David G, Riou R, Legrand N, Esbelin J, et al. New insights on the natural killer cell repertoire from a thorough analysis of cord blood cells. *J Leukoc Biol*. 9 janv 2016;100(3):471-9.

Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon

Béatrice CHARREAU (UMR INSERM U1064& ITUN, CHU de Nantes)

La dysfonction des cellules endothéliales associée à l'inflammation et l'artériosclérose du greffon sont des processus majeurs impliqués dans la pathogénèse du rejet de greffe. Nos travaux récents proposent un rôle important pour une protéine adaptatrice, Lnk (SH2B3), dans le rétrocontrôle des voies de signalisation associées à l'inflammation et la migration des cellules endothéliales. Ce projet poursuivra la caractérisation biochimique et fonctionnelle de la molécule LNK dans les cellules endothéliales humaine. Nous poursuivrons la caractérisation du panel de molécules inflammatoires inhibées par l'expression de Lnk dans l'endothélium. Nous analyserons le polymorphisme génétique de Lnk au sein d'une cohorte de greffes rénales pour lesquels nous avons des cellules endothéliales et de l'ADN du donneur afin d'évaluer son impact sur l'expression et l'activité de cette protéine dans les cellules endothéliales du greffon. Nous définirons également le rôle de Lnk dans les mécanismes de la prolifération et la différenciation (transition endothéliale/mésenchymateuse) cellulaire, processus impliqués dans l'initiation et la progression de la fibrose. Nous utiliserons un adénovirus recombinant pour Lnk pour valider, par transfert de gène in vivo, l'effet anti-inflammatoire de Lnk dans un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat. Enfin, la production d'un rat transgénique à expression ciblée dans l'endothélium sera une étape importante pour la validation du rôle régulateur et protecteur de l'adaptateur Lnk pour l'endothélium du greffon et son impact pour la prévention de l'inflammation et de l'artériosclérose du greffon dans un modèle d'allogreffe cardiaque. Cette étude devrait définir si Lnk peut être une cible moléculaire pour une approche thérapeutique visant une inhibition ciblée de l'inflammation et de l'artériosclérose en transplantation.

Poster

Caractérisation des propriétés régulatrices de la protéine LNK dans les cellules endothéliales et validation expérimentale pour le contrôle de l'artériosclérose du greffon

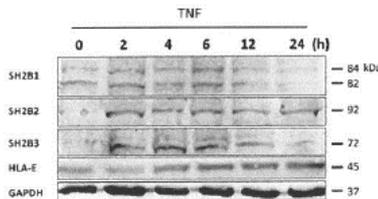
Sylvain Pagie, Claire Toquet, Nathalie Gérard et Béatrice Charreau

Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR_S1064, Equipe 5, European Center for Transplantation Science and Immunotherapy, LabEx Transplantex, Labex IGO, CHU de Nantes, Université de Nantes, France.

Objectifs de l'étude

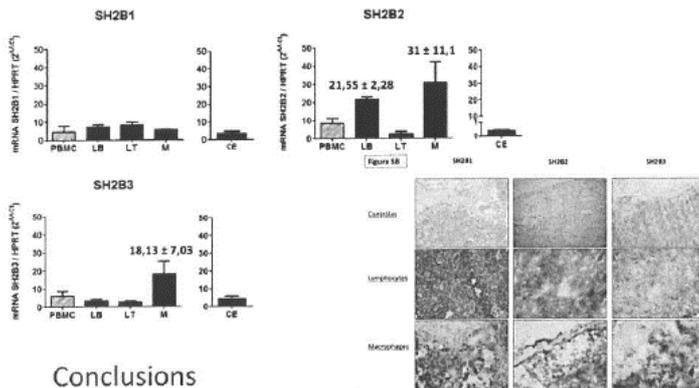
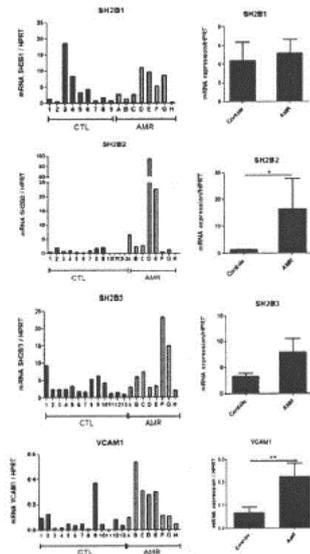
Les lésions causées aux cellules endothéliales (CE) du greffon par les anticorps dirigés contre le donneur (DSA) et l'activation du complément jouent un rôle important dans la vasculopathie d'allogreffe et le rejet à médiation humorale (AMR). L'objectif de ce projet était l'étude de l'expression des protéines adaptatrices de la famille SrcHomology2B (SH2B1, SH2B2 et SH2B3) dans le tissu cardiaque et les sous-populations leucocytaires, et leur régulation au cours du rejet humoral aigu, dans des biopsies de greffons cardiaques

Principaux résultats



seuls SH2B2 et SH2B3 sont régulés lors de l'activation endothéliale en réponse à l'inflammation avec cependant des cinétiques différentes

SH2B1 semble ubiquitaire. SH2B2 présente une expression restreinte aux cardiomyocytes et aux cellules musculaires lisses (CML) dans le coeur et une expression forte dans les monocytes/macrophages et les lymphocytes B. Dans le coeur, SH2B3 est localisé dans CML et majoritairement exprimé par les monocytes/macrophages. L'expression endothéliale de SH2B3 restreinte aux vaisseaux de gros calibre.



Au cours du rejet humoral, SH2B2 et SH2B3 sont augmentés de façon globale dans les greffons mais avec des variations individuelles suggérant une régulation mutuellement exclusive des SH2B.

Conclusions

Pour conclure, nous avons décrit au cours de ce projet, une régulation de l'expression des molécules SH2B2 et SH2B3, et une absence de régulation de SH2B1, lors de l'activation endothéliale et notamment lors du rejet humoral aigu. Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers à montrer une implication des protéines adaptatrices SH2B dans les mécanismes d'AMR induite par des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.

Contact: Dr. Béatrice Charreau; INSERM UMR_S1064, Nantes, France; Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Caractéristiques des donneurs potentiels dans le cadre du processus DDAC-Maastricht III au cours du coma post-anoxique

Alain CARIOU (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Cochin, Groupe Hospitalier Cochin Broca Hôtel-Dieu, Paris)

La France se trouve actuellement confrontée à une pénurie de greffon. Afin d'y remédier, la réflexion actuelle de l'Agence de Biomédecine porte sur l'élargissement du pool de donneur via la pratique du prélèvement chez les patients décédés après arrêt cardiaque. Cette dernière catégorie, dite donneurs décédés après arrêt cardiaque de la catégorie III de la classification de Maastricht (DDAC M III) est largement développée dans d'autres pays occidentaux et procure des greffons rénaux et hépatiques de bonne fonctionnalité à long terme. Si les patients en coma post-anoxique sont considérés comme de bons candidats au DDAC M III, certains problèmes se posent en France, d'ordre éthique, légal et logistique. Avant de s'investir dans la réalisation du prélèvement chez DDAC M III, l'évaluation quantitative et qualitative des patients éligibles pour cette procédure, et donc le nombre d'organes potentiels, est cruciale et constitue l'objectif de cette étude. En outre, l'identification des patients susceptibles de présenter une ischémie chaude de courte durée est le second but, afin de minimiser les démarches de don inutiles.

Nous proposons de mener une étude monocentrique rétrospective, consistant à compléter notre large base de plus de 1500 patients admis pour arrêt cardio-respiratoire réanimé depuis 2000. Cette étude pragmatique inclura tous les patients pris en charge dans les suites d'un arrêt cardiorespiratoire en réanimation médicale à Cochin entre janvier 2000 et décembre 2011, dont les données pré-hospitalières et hospitalières usuelles sont disponibles dans la base de données existante, d'âge supérieur ou égal à 18 ans et inférieur à 70 ans, décédant en réanimation après arrêt des soins et extubation en raison d'un coma post-anoxique. En se focalisant sur les patients dont l'évolution neurologique défavorable conduit à un arrêt des soins et à une extubation, nous récupérerons ainsi des données supplémentaires portant sur les variables épidémiologiques, cliniques et biologiques suivantes des donneurs potentiels :

- Délai entre la décision d'arrêt des soins, l'extubation et le décès
- Variables hémodynamiques, respiratoires et diurèse recueillies toutes les heures, ainsi que la présence éventuelle de médications inotropes ou vasopressives, ou un apport d'oxygène
- Fonction biologique rénale et hépatique
- Utilisation de drogues sédatives ou analgésiques au décours de l'extubation
- Proportion de donneurs potentiels sans famille ou proche identifié

Il s'agira de la première étude d'envergure en France disposant de la taille et des données nécessaires pour décrire le statut clinique et biologique des patients susceptibles de remplir les conditions du prélèvement d'organes DDAC M III. Au terme de ce travail, notre ambition est d'apporter les éléments de réflexion aux sociétés savantes en charge des recommandations de prise en les patients cérébro-lésés (SFAR et SRLF), à l'Agence de Biomédecine, et à la société française.

Influence de l'obésité sur les caractéristiques fonctionnelles des îlots humains : Les îlots d'obèses sont-ils les meilleurs îlots pour la thérapie cellulaire du diabète?

Julie KERR-CONTE (INSERM U859 / Université de Lille)

Objectif

La pénurie des pancréas disponibles est un frein important pour le développement de la greffe d'îlots. Les donneurs obèses ne sont généralement pas prélevés car ils ne sont pas utilisables pour la greffe de pancréas. L'objectif de ce projet est de **comparer les caractéristiques des îlots humains provenant de sujets obèses ou non obèses** afin d'évaluer leur potentiel en vue de l'allogreffe d'îlots.

Résultats attendus.

Le nombre d'îlots isolés à partir d'un pancréas humain semble corrélé à l'indice de masse corporelle du donneur. Les caractéristiques fonctionnelles des îlots de sujets obèses devraient être identiques voire supérieures à celles des îlots de sujets minces. Si leur fonction et leur survie in vivo après transplantation se révèle également satisfaisante, cette étude constituera un argument de poids pour **favoriser le prélèvement de pancréas chez les donneurs obèses** ou en surpoids afin **d'accroître le nombre de pancréas disponibles** pour la greffe d'îlots.

Méthodologie

- 1) Nous comparerons dans un premier temps les **caractéristiques morphologiques** des îlots des sujets obèses à ceux des sujets en surpoids et non obèses en profitant d'une *collection unique au monde* de blocs histologiques conservés depuis 5 ans lors de chaque isolement dans le cadre de notre programme clinique pour la traçabilité (n> 250 blocs).
- 2) Nous étudierons ensuite les **caractéristiques fonctionnelles** des îlots de sujets obèses ou non à l'aide des *techniques utilisés en routine* dans notre équipe pour qualifier les préparations d'îlots humains en vue de leur transplantation.
- 3) Enfin un *modèle original* mis au point par notre équipe (QIVIPA) pour quantifier la qualité des préparations d'îlots humains nous permettra d'étudier la **survie et la fonction des îlots in vivo**, après transplantation chez la souris immuno incompétente.

Publications :

1. Gargani S, Thévenet J, Yuan JE, Lefebvre B, Delalleau N, Gmyr V, et al. Adaptive changes of human islets to an obesogenic environment in the mouse. *Diabetologia*. févr 2013;56(2):350-8.
2. Latreille M, Hausser J, Stützer I, Zhang Q, Hastoy B, Gargani S, et al. MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. *J Clin Invest*. 2 juin 2014;124(6):2722-35.

Identification des critères diagnostiques du rejet humoral en transplantation hépatique

Catherine GUETTIER (Anatomie Pathologique, hôpital Paul Brousse, Paris)

Le rejet humoral représente une complication bien identifiée en transplantation cardiaque et rénale. Il nécessite un traitement lourd associant échanges plasmatiques, administration de rituximab et d'immunoglobulines intraveineuses. Son diagnostic repose sur les critères suivants : dysfonction inexplicable du greffon, lésions histologiques spécifiques, immunomarquage pour le C4d et présence d'anticorps spécifiques du donneur (DSA). En transplantation hépatique, le rejet humoral en situation ABO-compatible n'est pas défini : la recherche des DSA et l'étude immunohistochimique pour le C4d ne sont pas effectuées.

Le but de cette étude multicentrique est d'une part, de préciser les critères diagnostiques histologiques du rejet humoral en transplantation hépatique ABO-compatible à partir d'une sous-population de patients présentant des DSA et un immunomarquage positif pour le C4d sur leur biopsie hépatique ; d'autre part, de préciser la participation du rejet humoral dans les situations anatomo-cliniques de rejet aigu cellulaire et chronique, hépatite allo-immune et hépatite d'étiologie indéterminée,

L'étude prospective portera sur des patients adultes transplantés hépatiques ayant eu une ponction biopsie hépatique (PBH) protocolaire ou effectuée sur indication. Seront inclus les patients des 3 centres correspondant aux 200 PBH consécutives à partir du début de l'étude, quel que soit le délai post-transplantation.

L'immunomarquage C4d sera systématiquement réalisé sur coupes paraffine à l'aide de 2 Ac différents après validation et standardisation de la technique d'immunomarquage et de son interprétation. Les DSA seront systématiquement recherchés au moment de chaque PBH. Les données cliniques seront collectées à partir des dossiers. Les PBH seront analysées de façon collégiale sans connaissance des données cliniques ni du marquage C4d. Les résultats histologiques seront analysés en fonction du contexte clinique et du statut DSA/C4d.