

**Résumés/résultats des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel
d'offre 2013 « Recherche et greffe »
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
CHARREAU Béatrice	<u>Contrôle immunitaire de la réponse anti-CMV et alloréactivité croisée ciblant les cellules endothéliales du greffon : définition et analyse d'un nouveau facteur de risque</u>	30 000 €
GOODHARDT Michele	<u>Biomarqueurs épigénétiques en greffe de cellules souches hématopoïétiques : implication dans les complications post-greffe</u>	30 000 €
OLLERO Mario	<u>Récidive post transplant du syndrome néphrotique idiopathique : Identification et caractérisation de facteurs circulants de perméabilité glomérulaire</u>	30 000 €
THURET Gilles	<u>Bioingénierie de greffons cornéens endothéliaux à partir de cellules souches pluripotentes induites (hIPS human induced pluripotent stem cells)</u>	30 000 €
VIDAL-TRECAN Gwenaëlle & Yvon CALMUS	<u>Information aux futurs receveurs sur les risques liés aux dons : Evaluation des préférences des patients et des professionnels</u>	30 000 €
DAGHER Ibrahim	<u>Médecine régénérative personnalisée avec embolisation portale du foie pour la transplantation d'hépatocytes</u>	24 000 €
GILLET Pierre	<u>Cellules souches mésenchymateuses et ingénierie du cartilage : analyse protéomique du sécrétome comme index de chondrogenèse</u>	24 000 €
MALLONE Roberto	<u>Une thérapie cellulaire T adoptive dans la greffe des cellules hématopoïétiques souche de sang placentaire</u>	24 000 €
RIGOTHIER Claire	<u>Unité glomérulaire : de la conception à la validation</u>	24 000 €
VANTYGHM Marie-Christine	<u>Pronostic néphrologique 10 ans après thérapie cellulaire du diabète de type 1 : étude-cas témoin PRONOCELDIAB</u>	24 000 €
CHAPEROT Laurence	<u>Mécanisme d'action et optimisation de l'Immunothérapie par Cellules Modifiées par Photochimie (ICMP)</u>	20 000 €
ROUAS-FREISS Nathalie	<u>Rôle immunomodulateur de la cellule épithéliale bronchique sur la réponse allogénique T chez des patients greffés pulmonaires</u>	20 000 €
HILLION Sophie	<u>Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B au cours du rejet chronique humoral d'allogreffe</u>	15 000 €
LAYROLLE Pierre	<u>Ingénierie cellulaire osseuse : impact des cellules souches mésenchymateuses et monocytes d'origine syngénique ou allogénique</u>	15 000 €
LORENZO Hanz Christian	<u>Pathogénèse du syndrome néphrotique à hyalinose segmentaire et focale : rôle de Lin-2/CASK dans la récurrence après transplantation rénale</u>	15 000 €
TAUPIN Jean-Luc	<u>Détection in situ d'anticorps allogéniques anti-HLA spécifiques du donneur chez les transplantés cardiaques ou pulmonaires</u>	15 000 €
ANGOULVANT Denis	<u>Rôle des récepteurs purinergiques dans l'activation des cellules dendritiques au cours des lésions d'ischémie-reperfusion du greffon cardiaque (CardioDC)</u>	10 000 €
DI CRISTOFARO Julie	<u>Personnes issues de l'immigration à Marseille et Enrichissement de la banque de sang placentaire</u>	10 000 €

RABANT Marion	Rejet humoral en transplantation intestinale : Critères diagnostiques anatomo-pathologique et profils moléculaires	10 000 €

Thèmes de recherche :

- 1. Sciences humaines, économiques et sociales, santé publique, épidémiologie et/ou éthique dans le domaine du prélèvement, de la greffe et de l'insuffisance terminale d'organes**
- 2. Amélioration des prélèvements : évaluation et amélioration de la sécurité et de la qualité des greffons, modalités de conservation, étude des mécanismes de l'ischémie-reperfusion**
- 3. Modalités d'accès à la greffe et suivi des patients transplantés**
- 4. Pharmacologie et greffe**
- 5. Immunologie de la transplantation chez l'Homme (*)**
- 6. Ingénierie cellulaire et tissulaire comme alternative à l'allogreffe d'organes de tissus et de cellules**

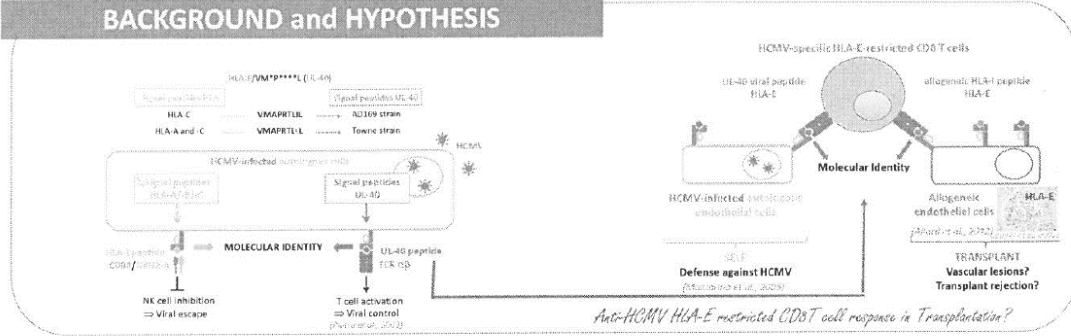
Contrôle immunitaire de la réponse anti-CMV et alloréactivité croisée ciblant les cellules endothéliales du greffon : définition et analyse d'un nouveau facteur de risque (Béatrice CHARREAU)

L'infection à CMV constitue un facteur de risque important chez les patients transplantés sous régime immunosuppresseur. Bien que cette infection soit associée à une diminution de la survie du greffon, les mécanismes impliqués demeurent mal connus. Parallèlement au rôle, primordial et connu de longue date, de la réponse lymphocytaire T $\alpha\beta$ CD8 dans le contrôle de l'infection à CMV, la contribution d'une **sous-population de TCD8 alloréactifs** non conventionnels reconnaissant des peptides communs au CMV et à certaines molécules HLA de classe I et **restreints par HLA-E** est une notion émergente. Nos travaux les plus récents portent sur la description et caractérisation d'une population lymphocytaire T CD8+ alloréactive, restreinte par HLA-E, reconnaissant des peptides du CMV et du HLA-I et capable d'induire *in vitro* la **lyse des cellules endothéliales** issues de donneurs. Dans un contexte de transplantation d'organes vascularisés, HLA-E est exprimée essentiellement par les cellules endothéliales du greffon qui constituent donc une cible allogénique privilégiée des lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8+ cytotoxiques induits par l'infection à CMV. Ce projet propose de rechercher la présence de cette population cellulaire que nous avons identifiée dans une cohorte de patients transplantés, d'analyser la fonction de ces cellules *in vitro* et de définir l'impact de cette alloréactivité croisée sur la fonction du greffon. **L'objectif principal** est d'établir la preuve de concept qu'un test cellulaire identifiant une population de T CD8+ dirigé contre un set de peptides communs au CMV et certains HLA de classe I et présentés par HLA-E pourrait prédire le devenir du greffon. **Les objectifs spécifiques** sont (1) la **mise au point d'un test de détection** sensible et spécifique, des populations TCD8 HLA-E restreintes dirigées contre le CMV dans le sang total par cytométrie multiparamétrique, et (2) **l'étude rétrospective et cinétique post-greffe d'une cohorte de patients transplantés rénaux** portant sur la détection de(s) population(s) TCD8+ HLA-E restreintes dirigées contre le CMV et des allopeptides. Si nous montrons dans ce projet que la présence de cette population cellulaire est associée à un risque accru de développer des lésions vasculaires et une dysfonction chronique du greffon, un **test diagnostique** sera développé. L'aspect novateur et appliqué du projet est soutenu par un **dépôt de brevet** (INSERM, Numéro de dépôt : EP12305823.2, Date de dépôt : 10 juillet 2012). Notre projet pourrait identifier un nouveau mécanisme impliquant le CMV dans le rejet de greffe et définir un **nouveau facteur de risque pour le devenir du greffon** lié à l'infection à CMV du receveur et au génotype du donneur.

ALLOREACTIVE HCMV-COMMITTED HLA-E-RESTRICTED CD8 T CELL RESPONSE: DEFINITION OF A NEW RISK FACTOR TARGETING GRAFT'S ENDOTHELIAL CELLS

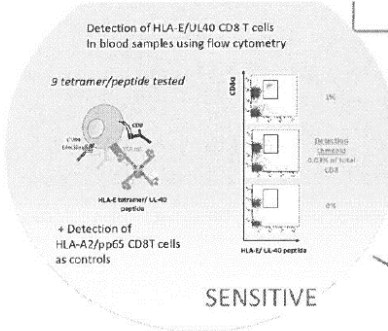
Jouand N., Giral M., Bressollette C., Gérard N., Cesbron A., Gervois N*, Charreau B*.

BACKGROUND and HYPOTHESIS

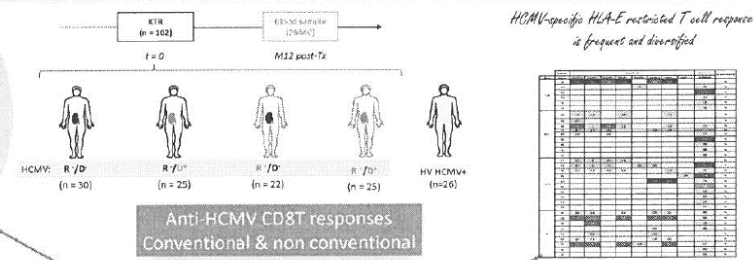


RESULTS

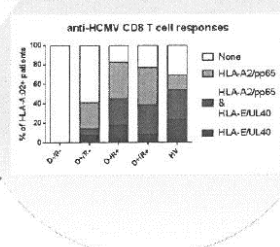
A DEDICATED DETECTION ASSAY



A retrospective cohort study (103 KTx & 26 HCMV+ HV)



Anti-HCMV CD8T responses Conventional & non conventional



HCMV-specific HLA-E-restricted T cells display an effector-memory phenotype

	HLA-A*02:01	HLA-B*07:02	HLA-C*07:01
Control	HLA-A*02:01	HLA-B*07:02	HLA-C*07:01
Conventional	VMAPRTLL	VMAPRTLL	VMAPRTLL
T cell markers	CD8, CD45R1, CD45RO	CD8, CD45R1, CD45RO	CD8, CD45R1, CD45RO
TCR-β	Vβ16, Vβ22	Vβ22	YES4
HLA-E/UL40 response	CD8EA1 ⁺ , CD8EA2 ⁺ , CD8E, CD8F, CD8G, CD8H, CD8I, CD8J, CD8K, CD8L		
HLA-E genotype	HLA-E*01:01	HLA-E*01:01	HLA-E*01:01
HLA-E/UL40 peptide	UL40-41, UL40-42, UL40-43, UL40-44, UL40-45, UL40-46, UL40-47, UL40-48, UL40-49, UL40-50, UL40-51, UL40-52, UL40-53, UL40-54, UL40-55, UL40-56, UL40-57, UL40-58, UL40-59, UL40-60, UL40-61, UL40-62, UL40-63, UL40-64, UL40-65, UL40-66, UL40-67, UL40-68, UL40-69, UL40-70, UL40-71, UL40-72, UL40-73, UL40-74, UL40-75, UL40-76, UL40-77, UL40-78, UL40-79, UL40-80, UL40-81, UL40-82, UL40-83, UL40-84, UL40-85, UL40-86, UL40-87, UL40-88, UL40-89, UL40-90, UL40-91, UL40-92, UL40-93, UL40-94, UL40-95, UL40-96, UL40-97, UL40-98, UL40-99, UL40-100		
HLA-E/UL40 peptide	UL40-41, UL40-42, UL40-43, UL40-44, UL40-45, UL40-46, UL40-47, UL40-48, UL40-49, UL40-50, UL40-51, UL40-52, UL40-53, UL40-54, UL40-55, UL40-56, UL40-57, UL40-58, UL40-59, UL40-60, UL40-61, UL40-62, UL40-63, UL40-64, UL40-65, UL40-66, UL40-67, UL40-68, UL40-69, UL40-70, UL40-71, UL40-72, UL40-73, UL40-74, UL40-75, UL40-76, UL40-77, UL40-78, UL40-79, UL40-80, UL40-81, UL40-82, UL40-83, UL40-84, UL40-85, UL40-86, UL40-87, UL40-88, UL40-89, UL40-90, UL40-91, UL40-92, UL40-93, UL40-94, UL40-95, UL40-96, UL40-97, UL40-98, UL40-99, UL40-100		

HCMV-specific HLA-E-restricted T cells can potentially recognize allogeneic HLA-E cells

Strain	HLA-E*01:01	HLA-E*01:02	HLA-E*01:03
D/R	100	0	0
D/R+	100	0	0
D/R+	100	0	0
D/R+	100	0	0
HV	100	0	0

PERSPECTIVES

- Restriction factors controlling the development of HLA-E- or/and HLA-A*02-restricted T responses upon HCMV reactivation?
 - Identify the HCMV strain and characterize the UL-40 protein
 - Access the impact of the recipient HLA-E genotype
- Pathogenic functions in kidney transplantation?
 - Correlate with clinical data and graft outcome?
 - Sort others HCMV-specific HLA-E-restricted CD8 T cells and characterize their phenotype and functions in vitro
 - Identify donor & recipient parameters that could play a role as risk factors (i.e. HLA-E genotype, KIR2D genotype; inhibitor receptors expression)?

MAJOR FINDINGS

- HCMV-specific HLA-E-restricted T cells :
 - Specific to the HCMV infection
 - Frequent among the HCMV+ patients (~30%) and among the CD8 T cells (up to 40%)
 - Varied (directed against several peptides from UL-40)
 - Long-lasting response (up to 65 months post-transplantation)
 - Recognize and kill HCMV- allogeneic endothelial cells in vitro

Biomarqueurs épigénétique en greffe de cellules souches hématopoïétiques : implication dans les complications post-greffe (Michele GOODHARDT)

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) demeure le traitement de choix pour un grand nombre d'hémopathies malignes et non malignes ainsi que pour diverses maladies génétiques. Une évolution favorable de cette thérapie est conditionnée par plusieurs facteurs, dont la source et la qualité des cellules souches. Dans ce contexte, apparaît progressivement au cours de l'âge une altération des fonctions des CSH qui pourrait être à l'origine d'une diminution de la reconstitution des cellules sanguines après greffe. Les études de notre groupe sur les CSH de moelle osseuse humaine ont montré que cette perte de fonction des CSH est associée à des modifications épigénétiques et plus particulièrement au niveau de la triméthylation de l'histone H3 (H3K9me3) et l'histone méthyltransférase, SUV39H1, qui catalyse cette modification.

Objectif : L'objectif de ce travail est de déterminer si le niveau de la modification épigénétique, H3K9me3 et de SUV39H1 sont des biomarqueurs prédictifs de la fonctionnalité des CSH et par conséquent, de l'évolution post-greffe. Pour cela nous réaliserons (i) une étude biologique pour étendre et valider les propriétés fonctionnelles de SUV39H1 et de H3K9me3 aux autres types de CSH: cordon et PBSC ; et (ii) une étude clinico-biologique prospective pour corrélérer le niveau d'expression de SUV39H1 et de H3K9me3 avec l'incidence et la sévérité des complications post GCSH et ainsi de valider leurs statut potentiel de biomarqueurs.

Résultats attendus : Cette étude devrait permettre la validation de biomarqueurs épigénétiques de la fonctionnalité des CSH et d'établir ainsi des critères de qualité des CSH en vue de greffe. Les modifications épigénétiques étant réversibles, il serait envisageable à terme de pouvoir intervenir sur la fonction des CSH avec des agents pharmacologiques agissant sur la chromatine, afin d'améliorer l'évolution des greffes des CSH.

Méthodologie: Nous comparerons le profil des modifications des histones dans les CSH CD34+CD38- de sang de cordon et de sang périphérique de donneur d'âges différents par des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP). Pour chaque donneur, nous analyserons également l'expression de SUV39H1 par RT-PCR quantitative et le niveau de H3K9me3 par cytométrie de flux. Ces paramètres seront comparés au potentiel de différenciation des CSH analysées en parallèle par des expériences de différenciation *in vitro* ainsi qu'aux données clinico-biologiques post-greffe.

Publication :

Djeghloul D, Kuranda K, Kuzniak I, Barbieri D, Naguibneva I, Choisy C, et al. Age-Associated Decrease of the Histone Methyltransferase SUV39H1 in HSC Perturbs Heterochromatin and B Lymphoid Differentiation. *Stem Cell Reports*. 14 juin 2016;6(6):970-84.

Récidive post transplant du syndrome néphrotique idiopathique : Identification et caractérisation de facteurs circulants de perméabilité glomérulaire (Mario OLLERO)

La récidive du syndrome néphrotique idiopathique (SNI) reste un problème de santé important en transplantation rénale. Elle peut conduire à une impasse thérapeutique et condamner les patients à une dialyse définitive. En dépit des progrès immunologiques majeurs dans la prévention des rejets d'allogreffe, nos connaissances de la physiopathologie de la récidive post transplant restent largement méconnues. Plusieurs arguments suggèrent que la récidive est due à un facteur circulant extra-rénal. Cette hypothèse a été l'objet d'une recherche intense, afin d'identifier et caractériser ce facteur circulant. Si plusieurs protéines ont été suggérées comme candidates, les résultats de ces recherches n'ont pas été conclusifs.

Notre projet aborde la recherche du ou des facteurs circulants d'hyperperméabilité glomérulaire par une approche protéomique originale qui permet d'éviter la complexité analytique associée au sérum sanguin. Nous postulons que le(s) facteur(s) sont secrétés par les cellules mononucléaires sanguines (PBMC) et proposons une analyse *ex-vivo* du sécrétome de ces cellules. Le projet proposé est divisé en trois étapes : (i) identification de facteurs candidats, (ii) confirmation de leur association à la maladie par une analyse spécifique comportant une évaluation qualitative et quantitative par qPCR et des tests ELISA chez des patients atteints de SNI avant et juste après la transplantation. Les contrôles incluent des patients atteints de syndrome néphrotique liés à d'autres causes ainsi que des sujets sains; (iii) création de modèles transgéniques dans le but de reproduire la maladie chez le rat. Si les résultats sont encourageants, un test ELISA sera rapidement disponible

A partir d'une étude préliminaire basée sur l'analyse protéomique comparative du sécrétome des PBMC isolées de patients d'INS avec récidive post-greffe et de contrôles sains, nous avons identifié trois facteurs candidats, que nous appellerons FR1, FR2 et FR3. Par PCR quantitative nous avons confirmé une expression plus importante des trois transcrits dans les PBMC de patients atteints de SNI en rechute, ainsi que chez des patients qui ont récidivé le SNI après transplantation alors que ces facteurs ne sont pas détectés dans les contrôles sains et surtout chez les patients atteints d'autres pathologies rénale notamment de glomérulopathie extra-membraneuse. Ces résultats suggèrent que ces trois facteurs circulants, inconnus, pourraient être impliqués dans la physiopathologie de la récidive.

Nous proposons un projet portant sur la caractérisation de ces trois facteurs, comportant les objectifs suivants : (i) détermination par des tests ELISA des niveaux sanguins de FR1, FR2 et FR3 dans les cohortes de patients atteints de SNI en dialyse, avant après transplantation rénale ainsi que chez les patients transplantés qui ont ou non récidivé; (ii) caractérisation des effets morphologiques et fonctionnels de FR1, FR2 et FR3 *in vitro* sur des lignées podocytaires et *in vivo* par injection directe des protéines recombinantes à des souris ; (iii) création de modèles transgéniques chez le rat afin de tenter de reproduire la maladie.

Le projet sera complété en deux ans. Les informations obtenues devraient amener au développement de tests de valeur prédictive et envisager des perspectives thérapeutiques qui permettraient une amélioration considérable de la prise en charge de ces patients.

Brevet :

Sahali D, PAWLAK A, Ollero M. Methods and kits for predicting the risk of relapse in patients suffering from idiopathic nephrotic syndrome [Internet]. WO2017149018A1, 2017

Bioingénierie de greffons cornéens endothéliaux à partir de cellules souches pluripotentes induites (hIPS human induced pluripotent stem cells) (Gilles THURET)

Objectifs

Les cellules hIPS (human induced pluripotent stem cells) sont des cellules humaines adultes initialement normalement différenciées puis reprogrammées in vitro en cellules présentant les caractéristiques des cellules souches, c'est-à-dire pluripotence et auto-renouvellement. Elles ont pour avantage de ne pas poser le problème éthique des cellules souches embryonnaires, en particulier pour envisager traiter des pathologies non létales comme en ophtalmologie. Nous souhaitons étudier les possibilités de différencier des hIPS en cellules endothéliales (CE) cornéennes, cellules moteur de la transparence et de la survie de la cornée, en les soumettant à différents microenvironnements dans le but d'obtenir une culture de masse pouvant servir de réserve inépuisable pour la bioingénierie de greffons endothéliaux à partir de fines lamelles de stroma de cornées humaines. Si aujourd'hui la greffe endothéliale classique nécessite la découpe d'une cornée donneuse pour un seul receveur, la bioingénierie de demain à partir de hIPS pourrait permettre d'en obtenir 3 à 5 par cornée donneuse.

Résultats attendus

Obtention de la preuve de concept (POC), à partir de hIPS commercialisées, de l'obtention de cellules différenciées possédant les principales caractéristiques des CE cornéennes : croissance en monocouche de cellules hexagonales jointes par jonction serrées (tight junction, ZO-1 positives) formant une barrière semi-perméable, arrêt de prolifération à confluence par inhibition de contact, présence de Na/K-ATPase capable de réaliser les transports ioniques indispensables à la fonction de « pompe endothéliale », capacité à réaliser la déturgescence d'un greffon cornéen œdémateux placé dans le bioréacteur original disponible dans notre laboratoire.

Méthodologie étape par étape

ETAPE 1/Expansion de hIPS commerciales in vitro

ETAPE 2/Tests de 5 stratégies différentes de différenciation en CE cornéennes :

- humeur aqueuse humaine (collection biologique déclarée du BiiGC)
- TGF- β , supplémentation en facteurs de croissance des cultures primaires (b-FGF, EGF)
- milieux conditionnés de cultures de différents types de CE cornéennes (primaires ou 3 lignées immortalisée) et de kératocytes du stroma postérieur de cornées humaines
- co-cultures avec ces mêmes types cellulaires
- cornées humaines entières (greffons) avec ou sans endothélio-Descemet

ETAPE 3/ Contrôles multimodaux des CE ainsi obtenues

- morphologiques (histologie et ultrastructure en MET/MEB)
- différenciation (principales caractéristiques des CE cornéennes)
- différence de potentiel électrique de part et d'autre (effet barrière)

ETAPE 4/ Reconstitution des premiers greffons bioingénierés par ensemencement des CE obtenues sur des lamelles de stroma cornéen décellularisé (POC déjà réalisée au laboratoire) servant de support mécanique pour une chirurgie similaire aux greffes endothéliales actuelles.

ETAPE 5/ Simulation chirurgicale sur le bioréacteur cornéen (projet soutenu par l'ABM en 2011)

- vérification de la bonne adhérence et de la survie cellulaire lors du pliage/dépliage, adhérence au stroma, capacité de déturgescence d'une cornée œdémateuse sans endothélio-Descemet = première étape de l'évaluation préclinique.

Information aux futurs receveurs sur les risques liés aux dons : Evaluation des préférences des patients et des professionnels (Gwenaëlle VIDAL-TRECAN & Yvon CALMUS)

Actuellement, en France, les médecins ne doivent demander une autorisation écrite aux futurs receveurs que pour une greffe d'organe d'un sujet porteur de virus des hépatites B ou C. Aucune réglementation particulière (lois de bioéthique, Agence de la Biomédecine, jurisprudence) n'oblige explicitement à informer les futurs receveurs d'autres risques associés au don d'organe, à la technique de prélèvement ou aux conditions de préservation et demander un consentement explicite chez les patients prouvant le reçu des informations. Il nous semble donc qu'il existe une discordance entre la connaissance accumulée sur ces risques, et l'information potentiellement proposée aux receveurs. Cette discordance suggère que le sujet est délicat, et qu'il doit faire l'objet d'une analyse précise avant d'être exposé au public et aux décideurs.

De nombreux facteurs de risques mettant en jeu la sécurité immédiate, à moyen et long terme du receveur sont bien établis et définissent ce qu'on appelle les greffons marginaux : **A) risque de dysfonctionnement du greffon** : a) « Expanded Criteria Donor » ou critères élargis de don (âge élevé, hypertension), b) donneur à cœur arrêté, c) durées d'ischémie froide ou chaude prolongées, d) organe partagé (pour le foie), **B) risque de transmission de maladies** : a) infectieuse dont facteurs comportementaux, b) cancéreuses.

Peu d'études ont porté sur l'information à donner aux futurs receveurs. Un article américain de 2008 (1) a tenté de lancer la réflexion sur la responsabilité des équipes face à ces informations. Les auteurs plaident pour une information de façon spécifique, informant le receveur qu'il peut refuser un greffon à risque, ou l'accepter pour accélérer l'accès au greffon et réduire le risque de mortalité en liste d'attente lorsqu'il s'agit d'un greffon vital. Trois attitudes sont, en fait, possibles : (a) Ne pas donner d'information particulière au receveur : l'équité peut conduire à estimer qu'il n'y a pas de raison de diriger un greffon de bonne qualité vers un patient plutôt que vers un autre, (b) **Proposer un groupe d'information « paquet »** sur l'ensemble des risques potentiels tel que proposé par les auteurs américains et demander au patient un accord global, (c) **Informé le patient des risques individuels potentiels des greffons** et l'autoriser à accepter ou à refuser le greffon pour chaque risque identifié. Nous nous proposons trois études principales : (1) dans le but d'approcher le type d'information donnée et confirmer nos motifs de recherche, nous réaliserons (a) une enquête chez les médecins habilités à inscrire les patients sur la liste nationale d'attente (LNA) pour évaluer les informations proposées aux patients et décrire la situation actuelle et (b) un groupe de discussion ou « focus group » pour évaluer les opinions des médecins impliqués dans la transplantation sur le type des informations à proposer aux patients ; (2) en deuxième étape, nous évaluerons les autres sources d'information pour les patients que les professionnels de santé (les sites internet et les associations de transplantés) par une enquête chez les patients et les présidents des associations ; et (3) nous essaierons d'évaluer les opinions des patients sur la LNA, lors d'un bilan pré transplantation hépatique, rénale, cardiaque ou pulmonaire et des patients déjà greffés à l'aide d'auto-questionnaires appropriés, reposant sur des scénarios prédéfinis par la technique de choix discrets.

Publications :

1. Kamran S, Calmus Y, Pomey MP, Vidal-Trécan G. What Kind of Information About Marginal Donors Is Available Through Sources Other Than Health Care Professionals for Patients on the Waiting List for Organ Transplantation? *interactive Journal of Medical Research*. 2015;4(3):e15.
2. Kamran S, Conti F, Pomey M-P, Baron G, Calmus Y, Vidal-Treacan G. Patients' Preferences in Transplantation from Marginal Donors: Results of a Discrete Choice Experiment. *Transpl Int*. 1 févr 2017;n/a-n/a.

Médecine régénérative personnalisée avec embolisation portale du foie pour la transplantation d'hépatocytes (Ibrahim DAGHER)

La transplantation d'hépatocytes est un traitement prometteur des maladies métaboliques héréditaires du foie pour pallier au manque de greffon hépatique. Les essais réalisés chez l'Homme, basés sur la transplantation autologue ou allogénique d'hépatocytes génétiquement modifiés, sont décevants. Cela est principalement dû à la faible efficacité de transduction et à la faible implantation des hépatocytes dans le foie. Chez les patients, il a été reconstitué au mieux 5% de masse thérapeutique dans le foie, alors qu'il faudrait reconstituer une masse thérapeutique supérieure à 10%. Nous avons amélioré : (i) l'efficacité de transduction des hépatocytes avec la transduction de la quasi-totalité des hépatocytes humains, et (ii) la procédure de transplantation autologue avec un repeuplement du foie de macaque à 5-10% par les hépatocytes transplantés grâce à une embolisation portale partielle (EPP), une technique utilisée en pratique clinique.

Ce projet vise à développer l'EPP résorbable répétée (EPPRR) pour augmenter le repeuplement du foie par des hépatocytes autologues génétiquement modifiés et atteindre ainsi une masse thérapeutique suffisante (10%) pour traiter les maladies métaboliques du foie. Le principe de cette nouvelle approche originale est d'effectuer une EPP réversible (EPPR) afin d'implanter sélectivement et efficacement les hépatocytes dans les lobes hépatiques non embolisés. Nous répèterons la même EPPR afin d'atrophier les mêmes lobes précédemment embolisés. Cette EPPRR accroîtra la taille des lobes non embolisés contenant les hépatocytes génétiquement modifiés et donc la masse thérapeutique au détriment des hépatocytes résidant dans les lobes embolisés.

Nous testerons l'efficacité thérapeutique de notre approche chez le rat Gunn, modèle animal de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 (CN). Deux types de cellules thérapeutiques issues du rat Gunn seront évaluées : des hépatocytes primaires et des cellules pluripotentes induites (iPS) différenciées en hépatocytes (iPS-Hep). Ces cellules seront génétiquement corrigées avant transplantation. De plus, comme il est possible de produire à volonté des iPS-Hep, nous ferons des transplantations itératives avec EPPR chez le même animal. Après transplantation, l'efficacité thérapeutique sera suivie en direct par mesure de la bilirubinémie. Nous devrions observer une baisse initiale de la bilirubinémie au moins de 30%. La bilirubinémie devrait diminuer progressivement et parallèlement à l'accroissement du taux d'hépatocytes thérapeutiques jusqu'à atteindre le seuil thérapeutique (30 μ M), voir la normalisation (<3 μ M).

Les perspectives seront de poser les bases d'une stratégie alternative efficace et transposable en clinique à la transplantation hépatique allogénique pour le traitement des maladies métaboliques du foie monogéniques dont le gène est cloné et caractérisé.

Publication :

Tranchart H, Koffi GM, Gaillard M, Lainas P, Poüs C, Gonin P, et al. Liver regeneration following repeated reversible portal vein embolization in an experimental model. *Br J Surg.* août 2016;103(9):1209-19.

Agence de la biomédecine

Poster

Médecine régénérative personnalisée avec embolisation portale du foie pour la transplantation d'hépatocytes

H. Tranchart^{1,2}, G.M. Koffi¹, M. Gaillard^{1,2}, A. Dubart-Kupperschmitt¹, I. Dagher^{1,2}

1-INSERM U1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France.

2-Service de Chirurgie Digestive Minimale Invasive, Hôpital Antoine Béclère, APHP, Clamart, France.

La **transplantation d'hépatocytes (The)** est un traitement prometteur des maladies métaboliques héréditaires du foie pour pallier le manque de greffon hépatique. Les essais réalisés chez l'Homme, basés sur la transplantation autologue ou allogénique d'hépatocytes génétiquement modifiés, sont décevants. Cela est principalement dû à la faible efficacité de transduction et à la faible implantation des hépatocytes dans le foie.

Ce projet visait à développer une technique innovante, **l'embolisation portale partielle résorbable répétée (EPPRR)** pour augmenter le repeuplement du foie et atteindre ainsi une masse thérapeutique suffisante pour traiter les maladies métaboliques du foie.

Au cours de la première partie du projet, nous avons mis au point et évalué la technique d'EPPRR chez le rat (Fig. 1). La procédure était bien tolérée. Nous avons démontré que la répétition de l'EPPR induisait efficacement une **régénération hépatique**, supérieure à celle obtenue avec une seule EPPR (Fig. 2).

Nous avons ensuite appliqué la technique d'EPPRR pour la The. Nous avons donc réalisé des transplantations d'hépatocytes marqués à la GFP chez différents groupes de rats. Nous avons pu montrer que l'EPPRR permettait une **prise de greffe plus importante** qu'avec une seule embolisation résorbable ou sans embolisation (Fig 3.)

Enfin, au cours de la troisième partie du projet, nous utilisons la technique de l'EPPRR pour optimiser la transplantation d'hépatocytes chez des rats porteurs d'une maladie métabolique héréditaire du foie. L'objectif est de démontrer que cette technique permet d'améliorer la prise de greffe après The au point d'obtenir un traitement efficace de la maladie du rat receveur, c'est-à-dire un **effet métabolique**.

Les perspectives seront de poser les bases d'une stratégie alternative efficace et transposable en clinique à la transplantation hépatique allogénique pour le traitement des maladies métaboliques du foie monogéniques dont le gène est cloné et caractérisé.

Figure 1. Portographie au cours d'une EPPRR

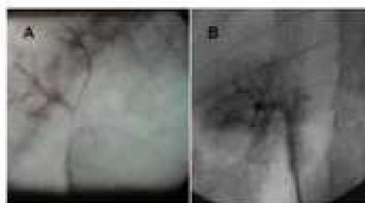


Figure 2. Prolifération hépatocytaire après EPPR et EPPRR

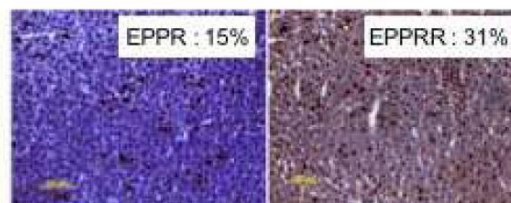
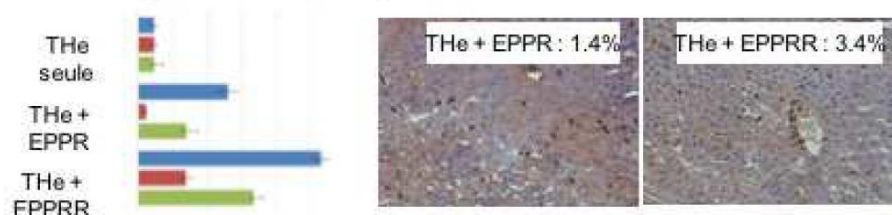


Figure 3. Prise de greffe après The associée à une EPPR ou une EPPRR



Cellules souches mésenchymateuses et ingénierie du cartilage : analyse protéomique du sécrétome comme index de chondrogenèse (Pierre GILLET)

Le cartilage hyalin est un tissu conjonctif avasculaire, non innervé et très spécialisé. Sa fonction principale est de protéger l'os sous-chondral des agressions. Une des voies thérapeutiques d'avenir des lésions du cartilage, l'ingénierie tissulaire, se propose de promouvoir la régénération, au sein même de la lésion, d'un néo-tissu proche du cartilage natif en apportant *in situ*, à la fois un contingent cellulaire susceptible de synthétiser les composants matriciels du cartilage (notamment des cellules souches mésenchymateuses, CSMs) et des matrices (scaffold) aux capacités structurantes et bio-inductrices. Cependant, les capacités réparatrices de ces implants restent imparfaites : d'une part, les greffons présentent une grande hétérogénéité de leurs caractéristiques métaboliques et d'autre part, les méthodes disponibles pour caractériser leur comportement phénotypique (immunohistochimie, qPCR), sont destructives et traduisent leur état métabolique de manière indirecte et qualitative. Récemment, dans notre laboratoire, une méthode non invasive permettant l'analyse quantitative relative du protéome sécrété par des cultures cellulaires dédiées en 2D - 3D a été développée. Cette méthode (Maldi TOFTOF) s'est avérée robuste pour traduire le métabolisme du composant cellulaire considéré de la MEC selon le milieu environnant.

Ce projet a pour objectif principal d'adapter et de valider une nouvelle stratégie de diagnostic non invasif pré-implantatoire d'un greffon fonctionnalisé en ingénierie du cartilage. Cette approche originale sera d'évaluer, par analyse du sécrétome dans le milieu de culture, les conditions favorables à la fonctionnalisation de l'implant, en vue de sa greffe ultérieure en site articulaire. Pour cela, nous proposons d'optimiser l'apport de la protéomique pour la caractérisation de biomatériaux colonisés par des CSMs humaines en vue de leur différenciation chondrogénique selon des conditions standardisées. Les procédés de préparation d'échantillon, les protocoles de séparation analytique, de spectrométrie de masse et de traitement des données seront optimisés en cherchant le meilleur compromis entre profondeur d'analyse (incluant les aspects quantitatifs), rapidité et coût (impact socio-économique). Le protocole retenu sera optimisé pour mesurer les variations inter-individuelles des implants, puis pour définir les meilleures combinaisons de facteurs de croissance (ITS seul (témoin), ITS+TGF- β 1, ITS+TGF- β 3, ITS+BMP-2, ITS+TGF- β 1+BMP-2, ITS+TGF- β 3+BMP-2) à utiliser pour générer des biomatériaux dont la bio-fonctionnalité paraît optimale.

Trois axes principaux ont été définis : (1) Optimisation de l'analyse quantitative relative des protéines sécrétées par les biomatériaux en éponges de collagène pour un usage routinier, (2) Validation statistique de la méthode d'analyse, comparaison à l'état de l'art et mise en évidence de la variabilité inter-échantillon et inter-patient au travers du contrôle qualité et (3) Détermination de la meilleure combinaison de facteurs de croissance favorisant la chondrogenèse (histologie) pour l'élaboration d'implant fonctionnalisé à visée articulaire.

Notre groupe dispose de par sa composition de toutes les compétences nécessaires pour mener à bien ce projet multidisciplinaire, multi-méthodes, et multi-échelles. La plate-forme de protéomique de notre fédération de recherche (FR 3209) localisée dans le Biopôle assurera les analyses nécessaires.

Publication :

Henrionnet C, Gillet P, Mainard D, Vincourt J-B, Pinzano A. Label-free relative quantification of secreted proteins as a non-invasive method for the quality control of chondrogenesis in bioengineered substitutes for cartilage repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 1 mars 2018;12(3):e1757-66.

Une thérapie cellulaire T adoptive dans la greffe des cellules hématopoïétiques souche de sang placentaire (Roberto MALLONE)

OBJECTIFS.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) à partir de progéniteurs provenant d'unités de sang placentaire (USP) est de plus en plus utilisée. Un inconvénient commun à toutes les approches de GCSH est l'état de déficit immunitaire qui précède la **reconstitution immunitaire**. Les infections intercurrentes pendant cette période (EBV, CMV, AdV) peuvent être fatales. Lorsque les CSH proviennent des donneurs adultes, le **transfert secondaire de lymphocytes du donneur** stimulés *in vitro* par des antigènes (Ags) viraux peut être utilisé afin d'augmenter les réponses T antivirales chez le patient. **Cette option n'est pas disponible pour les greffes d'USP**, puisque le donneur n'est pas disponible et l'USP est limitée en quantité.

Nous avons récemment développé une technique dite "**accelerated co-cultured dendritic cells**" (**acDC**) qui permet de **générer des cellules T** (CD4+ et CD8+) spécifiques d'Ags d'intérêt à partir de petits échantillons de sang (1-2 millions de cellules par Ag). Le principe de cette technique est d'induire directement *in situ* la différenciation des précurseurs des DC, à partir d'échantillons de PBMC non fractionnés, par une culture à court terme en présence des Ags d'intérêt. Ceci permet de générer et d'amplifier les cellules T spécifiques de ces Ags en stimulant leurs précurseurs, qu'ils soient mémoires ou naïfs. Les deux avantages majeurs de cette technique sont son **efficacité à amplifier** les fractions T d'intérêt et ses **besoins réduits en sang** (Martinuzzi et al., Blood 2011; brevet déposé par Inserm-Transfert). Ces caractéristiques rendent la technique acDC bien **adaptée pour développer des thérapies cellulaires T adoptives** pour les receveurs d'une greffe USP. Nous proposons donc d'explorer la faisabilité de cette approche.

METHODOLOGIE.

Nous nous concentrerons sur le **modèle adénovirus (AdV)**, car il s'agit de l'infection la plus difficile à contrôler, en particulier chez les enfants, faute de thérapies antivirales efficaces. Les échantillons d'USP seront obtenus auprès de la biobanque de l'hôpital St Louis à Paris. Grâce à l'approche acDC, nous examinerons **l'induction de DC** dans les cultures de cellules mononuclées de SP non fractionnées, et la stimulation et l'expansion des **cellules T spécifiques de l'AdV**, en utilisant des peptides immunodominants décrits dans la littérature. L'expansion des cellules T sera suivie par des tests fonctionnels (production d'IFN- γ , polyfonctionnalité) et par des tétramères HLA de Classe I et II. Les lignées et les clones T spécifiques de l'AdV ainsi générés seront ensuite **caractérisés *in vitro*** pour leur **efficacité à lyser des cibles** pulsées avec les peptides AdV ou infectées avec l'AdV, pour leur **absence d'allo-réactivité** et pour leurs **propriétés fonctionnelles** corrélées avec une efficacité clinique (polyfonctionnalité, haute avidité pour l'Ag).

RESULTATS ATTENDUS.

Cette approche utilise des **réactifs compatibles avec les Good Manufacturing Practices** et, en cas de succès, pourrait être rapidement **appliquée en clinique** afin de traiter les infections intercurrentes chez les receveurs d'une greffe d'USP.

Unité glomérulaire : de la conception à la validation (Claire RIGOTHIER)

Plusieurs alternatives aux traitements actuels de suppléance de la fonction rénale peuvent être envisagées : le rein artificiel, la réparation tissulaire par les cellules souches, la thérapie génique et l'ingénierie tissulaire rénale. Le développement éventuel d'un rein bio-artificiel nécessite de nombreuses étapes. Sa conception implique une modélisation de ses différentes structures, parmi lesquelles le glomérule. Le glomérule, peloton vasculaire recouvert d'une membrane basale tapissée par des podocytes, assure la fonction de filtration.

Notre objectif est de reproduire l'agencement glomérulaire en créant une unité glomérulaire par ingénierie tissulaire. A l'aide de techniques de microfabrication : micro-impression d'éléments biologiques assistée par laser et microfluidique, une structure tissulaire tubulaire organisant en 3 dimensions cellules humaines glomérulaires, endothéliales et podocytaires sera obtenue. La technique de micro-impression est basée sur le dépôt contrôlé (localisation, épaisseur et forme) de microgouttelettes de suspension cellulaire permettant l'obtention d'une structure en 3 dimensions tout comme la technique de microfluidique basée sur l'écoulement de fluides à l'origine de la formation d'une fibre cellulaire en présence d'une suspension cellulaire et d'agents réticulant. A une étude de la viabilité cellulaire succèdera une étude des caractéristiques cellulaires et tissulaires de ce modèle : nous attendons du fait de la reproduction des interactions cellulaires des phénotypes proches de la physiologie. Afin de reproduire les conditions physiologiques et notamment le régime de contraintes physiques, l'unité glomérulaire sera placée au sein d'une chambre de flux et soumise à des contraintes de flux par la technique de microperfusion *in vitro*. Enfin, dans l'optique de modéliser les pathologies rénales et leur prise en charge thérapeutique, cette unité sera exposée à différents agonistes. La conception d'une unité glomérulaire permettra de mieux appréhender la physiopathologie glomérulaire, pré-requis au développement de la bioingénierie tissulaire rénale.

Pronostic néphrologique 10 ans après thérapie cellulaire du diabète de type 1 : étude-cas témoin PRONOCELDIAB (Marie-Christine VANTYGHM)

OBJECTIFS

Les résultats de la thérapie cellulaire du diabète de type 1 s'améliorent continuellement avec une insulinoindépendance associée à une HbA1c normale variant entre 25 et 50% à 5 ans, 80% des patients conservant un C-peptide détectable. Outre l'injection de 2 à 3 préparations d'îlots, cette thérapie cellulaire requiert un traitement immunosuppresseur qui peut avoir des effets délétères en particulier sur le plan rénal. Par ailleurs, le bénéfice de la greffe en termes de prévention ou stabilisation des complications du diabète n'a pas été évalué à long terme. Dans un travail préliminaire mené sur 5 ans, nous avons constaté une stabilisation ou une amélioration des complications microangiopathiques par rapport aux données pré-greffes (EASD 2012).

Néanmoins, nous ne disposons pas de groupe témoin. L'objectif de cette étude est de comparer l'évolution des complications notamment néphrologiques du diabète 10 ans après greffe d'îlots par rapport à un groupe témoin de diabétiques de type 1 recevant une insulino-thérapie optimisée, initialement évalués en vue d'une greffe mais non inclus.

RESULTATS ATTENDUS

Une moindre détérioration ou une stabilisation de la fonction rénale des patients greffés 10 ans après greffe d'îlots en comparaison aux sujets non greffés est attendue.

METHODOLOGIE

Etude cas-témoins comparant, 10 ans après évaluation pour une greffe d'îlots, les patients diabétiques de type 1, ayant effectivement reçu une greffe d'îlots selon le protocole d'Edmonton et ceux n'en ayant pas reçu.

Patients :

- patients diabétiques de type 1 avec C-peptide indétectable, greffés rénaux ou non
- ayant consulté en vue d'une greffe d'îlots **il y a au moins 5 ans**

Critère de jugement principal :

Filtration glomérulaire estimée par la formule MDRD 10 ans après greffe d'îlots ou évaluation pour greffe

Critères de jugement secondaires

Microangiopathie

Néphrologie

Créatininémie, clairance de la créatinine à l'Iohexol

Microalbuminurie ou protéinurie en mg/24h

Ponction biopsie rénale chez les greffés rénaux

Ophthalmologie

% d'hémorragie du vitré, d'intervention pour cataracte, de photocoagulation, de traitement pour maculopathie

Acuité visuelle, OCT (Optical Coherence Tomography)

Neurologie

Electromyogramme (amplitude et vitesses de conduction sensitives et motrices des membres inférieurs)

Testing neuro-végétatif (hypotension orthostatique, espace R-R, fréquence cardiaque en inspiration, Valsalva)

Macroangiopathie

Clinique (angioplastie, stent, infarctus, insuffisance cardiaque, accident vasculaire, décès, tabagisme)

MAPA (Monitoring de pression artérielle ambulatoire) : pression artérielle moyenne

Echodoppler des vaisseaux du cou et des membres inférieurs : épaisseur intima-media, calcifications

Scintigraphie myocardique MIBI

Paramètres biologiques

Glycémie, insulïnémie et C-peptide à jeun et post-prandiaux, β score, HbA1c, Holter glycémique

HDL et LDL- cholestérol, triglycérides

Anticorps anti-GAD, ICA, IA2, anti-HLA

Immunophénotypage lymphocytaire, Dosage de Tacrolimus et Sirolimus

Sérothèque, plasmathèque, DNA thèque

Paramètres Thérapeutiques

% de patients traités par anti-diabétiques oraux, par analogues du GLP1, par insuline; dose d'insuline (U/jour)

% de patients traités par hypolipémiant, par anti-hypertenseur, nombre d'antihypertenseurs

Mécanisme d'action et optimisation de l'Immunothérapie par Cellules Modifiées par Photochimie (ICMP) (Laurence CHAPEROT)

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est une immunothérapie cellulaire autologue basée sur l'injection de cellules mononucléées modifiées par photochimie (ICMP), utilisée dans le traitement des lymphomes T cutanés, en prévention ou traitement du rejet du greffon (greffes d'organe) et de la maladie du greffon contre l'hôte après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les pathologies qui sont améliorées par l'ICMP ont pour point commun d'impliquer des cellules T « pathogènes » circulantes, qu'elles soient monoclonales (cas des lymphomes T) ou polyclonales (clones T alloréactifs dans les transplantations). Quelles que soient les indications, le but de l'ICMP est de moduler l'activité du système immunitaire vis à vis des cellules T « pathogènes » responsables des manifestations cliniques, mais les mécanismes de cette immunomodulation sont encore mal connus.

L'hypothèse que nous faisons est que la transfusion de cellules contenant une quantité élevée de lymphocytes T pathogènes modifiés photochimiquement va entraîner une intervention spécifique et ciblée du système immunitaire, en lien avec l'hypothèse émergente de la « mort immunogène ». En effet, dans des modèles d'étude *in vitro* le traitement PUVA (Psoralène+UV-A) de cellules mononucléées induit l'apoptose de l'ensemble des cellules traitées (lymphocytes, monocytes), suivant une cinétique propre à chaque type cellulaire, mais plus rapide pour les lymphocytes T activés que pour les autres cellules.

Le projet de recherche aura donc pour objectif de comprendre *in vitro* comment les lymphocytes T pathogènes participent à l'induction d'une mort par apoptose immunogène, induisent une immunomodulation spécifique des lymphocytes T « pathogènes ». Nous analyserons en détail les signaux de danger émis par les cellules T traitées par PUVA et la manière dont ces signaux sont régulés et influencent les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages qui vont interagir avec elles. Parallèlement, puisque nous pensons que les lymphocytes T pathogènes sont responsables de l'effet immunomodulateur de l'ICMP, nous proposons une optimisation du processus de PCE, en constituant des doses de produit cellulaire enrichi en lymphocytes T pathogènes triés puis amplifiés *in vitro*, et congelés, qui permettrait de rendre le traitement plus supportable pour les patients. Ce procédé permettrait de réduire les inconvénients de cytophères multiples, et constituerait une optimisation certaine du traitement tout en confirmant l'hypothèse avancée. Nous mettrons donc au point une technique de tri et d'amplification *in vitro* des lymphocytes T alloréactifs, utilisant des techniques compatibles avec un transfert vers la clinique, et évaluerons *in vitro* l'effet immunomodulateur de ces cellules amplifiées traitées par PUVA, en comparaison avec l'effet de cellules non amplifiées préalablement.

Une meilleure connaissance des mécanismes d'action de l'ICMP pourra entraîner un élargissement des champs d'application de cette thérapeutique, ainsi qu'une amélioration des protocoles cliniques. Si nos résultats permettent de diminuer le nombre d'aphérèses nécessaires, le traitement sera plus facile à supporter, et pourra être plus largement proposé, en particulier pour traiter les GVHD complications des greffes de moelle osseuse chez l'enfant.



Potential immunogenicity of PUVA-induced cell death

Coppard C.¹ Hannani D.², Gabert F.¹, Perruche S.³, Plumas J.¹, Chaperot L.¹
¹EFS-UGA-INSERM U1209 immunobiology and immunotherapy of chronic diseases, Grenoble, FRANCE
²PDC*line pharma SAS, Grenoble, FRANCE
³INSERM UMR1098, EFS, UBFC, LabEx LipSTIC, Besançon, FRANCE



Introduction

Extracorporeal photopheresis (ECP) is a cellular immunotherapy treatment based on the apheresis and reinfusion of autologous peripheral blood mononuclear cells treated ex-vivo by a photosensitizing agent (8-methoxypsoralen, 8-MOP) and irradiated by UV-A. This treatment is used for several T cell mediated diseases such as cutaneous T cells lymphoma (Sezary syndrome), graft versus host disease (GvHD) and auto-immune pathologies. All of these diseases share a common feature, the presence of « pathogenic » T-cells (tumoral, alloreactive and auto-immune T-cells, respectively). ECP is routinely used in many clinical centers worldwide. *In vitro*, ECP is modeled by « PUVA-treatment » where mononuclear cells are treated with an optimized dose of psoralen (8-MOP: 200ng/ml) and irradiated by UV-A (2J/cm²). *In vitro*, mononuclear cells such as T cells, monocytes and dendritic cells treated by PUVA undergo apoptosis. In our laboratory, we have described that activated T cells undergo apoptosis faster than resting T cells (Hannani et al., 2010). Reinfusion of these apoptotic cells may have various consequences according to the treated pathology. In cutaneous T cell lymphoma it leads to the tumoral T cell disappearance whereas it leads to the control of allogeneic T cells in GvHD (Hannani, 2015). Two different hypotheses have been proposed to explain these differential effects. But, to date, the precise mechanism of action (MoA) is still poorly understood.

Two Hypotheses...



ECP-induced cell death promotes regulatory T cells.
 → auto-immune diseases, GvHD, organ transplant rejection.
 Regulatory molecules associated with apoptotic cells are :
 • phosphatidylserine
 • ADP, adenosine

ECP-induced cell death promotes anti-T cell response.
 → T cell lymphoma
 DAMPs associated with apoptotic cells are :
 • Calreticulin (CRT)
 • HMGB1-ox
 • ATP
 • Hsp70/90

Damage-associated Molecular Pattern Molecules (DAMPs) have been described as endogenous signals expressed or released by cells in various situations of stress or tissue injury. Recently it has been shown that some cell death inducers including some chemotherapy drugs (i.e. anthracyclins) (Green 2009, Zitvogel 2010, Kroemer 2013, Hannani 2011) or photodynamic treatment (Garg, 2014) provoke a pre-mortem ER-stress that leads to DAMPs emission, rendering apoptosis as an immunogenic process, able to reactivate anti-tumor immune response.

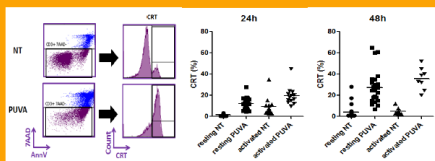
These phenomenon are described as immunogenic cell death, it involves :

- **Calreticulin:** An « Eat-me » signal and mediator of tumour immunogenicity crucial for anti-tumour immunity (Obeid, 2007).
- **HMGB1:** In extracellular medium acts as an alarmin, attracts various immune cells and causes dendritic cell maturation (Apetoh, 2009).
- **ATP:** is a « find me » signal that causes NLRP3-inflammasome activation and subsequently production of IL-1 β and IL-18 by dendritic cells (Ghiringelli, 2009), attracts monocytes and provokes their differentiation into dendritic cells in-situ (Ma, Immunity, 2013)
- **Hsp70/90:** Attract monocytes and neutrophils and cause NK cell activation and dendritic cell maturation.

Does ECP induce an Immunogenic cell death?

1) PUVA-treated resting and activated T cells express ecto-Calreticulin

CRT is an endogenous chaperone protein that resides in endoplasmic reticulum lumen (ER) where it has a calcium regulatory functions, in physiological conditions. Following ER stress, the protein eIF2 α is phosphorylated and permits the exposition of CRT at cell surface (ecto-CRT). In the plasmatic membrane, CRT has an immunomodulatory function, as it acts as a « eat-me » signal promoting phagocytosis. Ecto-CRT has a key role in immunogenic cell death (Hannani; cancer journal, 2011). The modulation of CRT expression following PUVA treatment was evaluated on T cells. PUVA induces ecto-CRT expression. The expression of ecto-CRT is higher on activated T cells treated by PUVA than on untreated or resting T-cells.

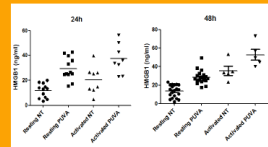


PBMCs are isolated from blood by gradient density. Allogenic mixed lymphocyte reaction was performed by mixing allogenic PBMCs from two donors to obtain alloreactive activated cells. After 6 days of incubation, cells were treated or not by PUVA and incubated at 37°C and 5% CO₂. At 24h and 48h, cells were labeled (CD3, HLA-DR, CRT, AnvV and 7AAD) and analysed by flow cytometry.

2) PUVA-treated activated T cells release HMGB1



High mobility group box 1 protein (HMGB1) is an important nuclear chromatin protein. In physiological conditions, it is localized in the nucleus, but during necrosis and late-apoptosis HMGB1 is released by dying cells. Extracellular HMGB1 acts as an alarmin and promotes DC maturation. The release of HMGB1 by PUVA treated cells was measured at 24 and 48h. PUVA-treated activated PBMCs release higher levels of HMGB1 than untreated activated PBMCs and resting cells.

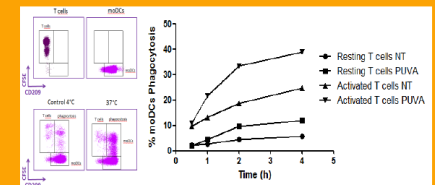


PBMCs are isolated from blood by gradient density. Allogenic mixed lymphocyte reaction was performed mixing allogenic PBMCs from two donors to obtain alloreactive activated cells. After 6 days of incubation, cells were treated or not by PUVA and incubated 48h at 37°C and 5% CO₂. At 24h and 48h, the supernatant were collected and HMGB1 secretion was analysed by ELISA.

3) MoDCs phagocytose PUVA-treated activated T cells.

Since CRT is highly exposed on the cell surface of PUVA-treated cells, we wanted to know if monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were able to phagocytose activated T cells treated by PUVA.

We co-incubated autologous moDC and PUVA-treated or untreated T cells. We observed that moDCs preferentially phagocytose activated T cells treated by PUVA compared to untreated and resting T cells.

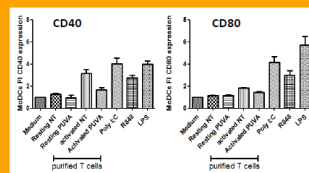


Monocytes are isolated from blood by gradient density and negative selection (easy sep kit). They are incubated 6 days in RPMI +10% FCS, with IL-4 and GM-CSF, to obtain monocyte-derived dendritic cells (moDCs). Resting and activated T cells are treated or not by PUVA. 24h after the treatment, cells were labeled by CFSE and put in co-culture with autologous moDCs at 37°C. At different time points, cells are labeled with CD3 and CD209 antibodies, and analysed by flow cytometry. The negative control has been made at 4°C (N-6).

4) MoDCs mature in contact with activated T cells

Since immunogenic cell death promotes DC maturation, we assessed if PUVA-treated T cells induce DC maturation.

Monocyte-derived dendritic cells (moDCs) mature more in contact with activated T-cells and express more CD40 and CD80 than when in contact with resting T cells. Similar results have been obtained when T cells have been co-cultured with monocytes or macrophages.



Monocytes are isolated from blood by gradient density and negative selection. They are incubated 6 days in RPMI +10% FCS, with IL-4 and GM-CSF, to obtain monocyte-derived dendritic cells (moDCs). Resting and activated T cells are treated or not by PUVA. 24h after the treatment, T cells were put in co-culture with autologous moDCs and incubated 48h at 37°C, 5% CO₂. Three moDCs activation positive controls are used (Poly(I:C), R848 and LPS). MoDCs were labeled with different markers of activation (CD40, CD80, CD86, HLA-DR) and analysed by flow cytometry. For CD40 and CD80 graphs represented the fold increase of mean fluorescence intensity (N=7).

An animal model of ECP: treatment of arthritic mice...

Collagen induced arthritis (CIA) is a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis. CIA is induced by a subcutaneous immunization (base of the tail) with an emulsion of complete Freund's adjuvant and type II collagen. The arthritic symptoms appear about 25 days after immunization and clinical evolution of arthritis can be scored on mice feet and toes. When the arthritis is fully developed (~40 days after immunization), mice can be treated by ECP i.e. reinfusion of PUVA-treated arthritic splenocytes, intravenously. Ongoing experiments will confirm the validity of this model for studying ECP mechanisms of action.



Conclusions and perspectives

Our results show that PUVA induces the up-regulation of Calreticulin at the surface of treated cells. We show that PUVA-treated activated alloreactive T cells produce higher levels of DAMPs than resting T cells. The ecto-CRT expression is associated with the release of HMGB1 but not ATP (not shown). PUVA-treated resting T cells are poorly engulfed by moDCs and do not trigger their maturation. Conversely moDCs efficiently engulf apoptotic activated alloreactive T cells and mature when in contact with them. These results suggest that PUVA-induced cell apoptosis could be an immunogenic process.

Since CIA model recapitulates human setting, depletion of different cell populations (among treated cells or in the treated mice) will be performed to identify which cells are responsible for the ECP clinical effect.

Rôle immunomodulateur de la cellule épithéliale bronchique sur la réponse allogénique T chez des patients greffés pulmonaires (Nathalie ROUAS-FREISS)

Le rejet chronique, sous la forme d'une bronchiolite oblitérante, reste la première cause de mortalité chez les patients greffés pulmonaires. La cible de ce rejet chronique est la cellule épithéliale bronchique (CEB), via des lésions cellulaires impliquant une interaction entre cellules dendritiques des voies aériennes, cellules T du receveur, et cellules épithéliales bronchiques. De nombreuses données *in vitro* et en transplantation d'organes suggèrent un état de tolérance associée à l'expression de la molécule HLA-G, par la modulation des fonctions des cellules effectrices de la réponse immune (cellules NK, T, et présentatrices de l'antigène [APC]). En greffe pulmonaire chez l'homme, nous avons montré préalablement que l'expression de HLA-G par les CEB était corrélée à la stabilité du greffon pulmonaire.

Afin de reproduire les mécanismes les plus proches de la réalité, nous proposons d'étudier une réaction mixte entre les APC et les lymphocytes T (Ly-T) autologues de patients greffés pulmonaires en état stable, ou en rejet chronique en présence de CEB du greffon. Vingt patients greffés pulmonaires seront inclus (10 patients stables et 10 en rejet chronique), dont les CEB seront isolées à partir de biopsies endobronchiques prélevées par fibroscopie, mises en cultures primaires, et stimulées avec l'IFN- γ . En parallèle, une différenciation de monocytes périphériques des mêmes receveurs sera effectuée en présence ou non du surnageant issu de ces cultures de CEB. Enfin, Une réaction mixte sera effectuée entre les Ly-T et les APC dérivées des monocytes, toujours en présence de CEB et de leur surnageant. Le rôle potentiel du microenvironnement (incluant la molécule HLA-G, et l'IL-15) des cultures primaires de CEB sur la différenciation monocyttaire en APC et sur la prolifération lymphocytaire lors de la réaction mixte seront analysés.

L'étude du dialogue entre la cellule épithéliale bronchique et les cellules immunitaires du receveur se base sur l'hypothèse qu'un des premiers niveaux de modulation serait lié à la capacité de la CEB de jouer directement le rôle d'APC vis-à-vis des Ly-T. Deuxièmement, la CEB pourrait affecter la fonction des cellules immunitaires (cellules dendritiques et Ly-T) en produisant un microenvironnement favorable, via la sécrétion de facteurs solubles. L'implication de la molécule HLA-G dans ce microenvironnement sera recherchée.

Pour réaliser ces objectifs, deux équipes de recherche vont potentialiser leur savoir-faire en immunologie et en physiopathologie respiratoire associées au service clinique de pneumologie de l'hôpital Bichat. Le caractère ambitieux de ce projet réside dans la prise en compte de l'immunité locale dans le greffon pulmonaire à travers l'étude des propriétés immunologiques de la cellule épithéliale bronchique du greffon et sa capacité à contrôler la réaction de rejet. Ce projet devrait ainsi permettre de préciser le rôle de la cellule épithéliale bronchique comme acteur majeur modulant la réponse immunitaire du receveur.

Publication :

Dupin C, Lhuillier E, Létuvé S, Pretolani M, Thabut G, Mal H, et al. Inhibition of T Cell Alloreactivity by Bronchial Epithelium Is Impaired in Lung Transplant Recipients, Through Pathways Involving TGF- β , IL-10 and HLA-G: Transplantation. sept 2017;101(9):2192-9.

Poster

Rôle immunomodulateur de la cellule épithéliale bronchique sur la réponse allogénique T chez des patients greffés pulmonaires

Coordinateur: Rouas-Freiss Nathalie^{1,2} et Partenaires: Pretolani Marina³ et Brugière Olivier⁴

¹CEA, IMETI, Service de Recherche en Hématologie-Immunologie, Hôp. Saint-Louis, Paris, France ²Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IUH, UMR E5, Paris, France, ³INSERM U1152, Université Paris 7, site Bichat, Paris, France, ⁴Service de Pneumologie B, Hôp. Bichat, Paris, France

Introduction

Transplantation pulmonaire (TxP)

- ✓ Traitement validé pour les maladies respiratoires terminales.
- ✓ Survie à long terme limitée par la survenue fréquente d'une dysfonction chronique du greffon: syndrome de bronchiolite oblitérante (SBO)
- ✓ Survie médiane après TxP = 5,6 ans

HLA-G

- ✓ Molécule TOLÉROGÈNE
- ✓ 4 formes solubles, 3 formes membranaires
- ✓ Complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 non classique
- ✓ Récepteurs inhibiteurs: ILT2, ILT4
- ✓ Expression inducible en pathologie: après transplantation d'organe (dont la cellule épithéliale bronchique (CEB) en TxP), cancer, pathologie virale ou inflammatoire.
- ✓ Rôle dans le rejet chronique en TxP?

Syndrôme de bronchiolite oblitérante (SBO)

Impact

- 1^{ère} cause de mortalité tardive chez les receveurs
- 50% des receveurs atteints à 5 ans de la TxP
- Absence de biomarqueur
- Traitements immunosuppresseurs incapables de prévenir l'apparition du SBO

Histologie

- Remaniement inflammatoire fibro-prolifératif
- Localisation: sous-muqueuse des bronchioles distales → occlusion partielle ou totale du calibre luminal
- Cellules impliquées: cellules épithéliales bronchiques (CEB), cellules dendritiques (CD) et lymphocytes T (LyT)

Physiopathologie

- Immunité cellulaire: rôle central de l'interaction cellules présentatrices d'antigène (CPA) des voies aériennes et lymphocytes T (LyT) par présentation antigène du donneur. Réponse Th1.
- Immunité humorale: anticorps (Ac) spécifiques du donneur, auto-Ac.
- CEB: pilier de la régulation immunitaire locale.

Hypothèse

Le SBO post-TxP est lié à une dysrégulation de l'homéostasie immunitaire médiée par les CEB.

Objectifs

Etude du dialogue entre CEB, LyT et CPA chez des patients greffés pulmonaires à l'aide d'un modèle ex-vivo

- ➔ **Objectif principal**: évaluer les propriétés immunosuppressives des CEB sur la réponse T-allogénique chez les greffés pulmonaires vs contrôles sains.
- ➔ **Objectif secondaire**: évaluer le rôle d'agonistes tolérogènes dans cette inhibition (HLA-G, IL-10, TGF-β, PGE2)

Matériels et méthodes

Origine des prélèvements

Collaborations avec les équipes de:

- ✓ Pneumologie B et de Transplantation Pulmonaire de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard
- ✓ Chirurgie Thoracique de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard
- ✓ ERS de l'Hôpital Saint-Louis

Patients

Biopsies bronchiques, LBA, Sang périphérique, PBMC

Témoins

Biopsies bronchiques, Brosses de Donneur d'organe, Biopsies, Digestion, Culture primaire, CEB

Populations cellulaires

- CEB en culture primaire: issues de biopsies prélevées en fibroscopie (photo: CEB en phase de croissance sortant d'une biopsie bronchique)
- PBMC (des MLR): isolés par centrifugation sur Ficoll
- LCL (des MLR): lignée cellulaire exprimant fortement CMH II

Profil de cytokines et dosage HLA-G

- Dans LBA, plasma et surnageant de CEB,
- ✓ Par ELISA: TGF-β, HLA-G,
- ✓ Par LUMINEX: 18 cytokines

Immunomarquage HLA-G

- ✓ Sur CEB: lames blanches de biopsies bronchiques (Immunohistochimie)
- ✓ Sur cellules alvéolaires: cytopspin obtenus par centrifugation du LBA

Influence de la CEB sur la réaction mixte lymphocytaire (MLR)

Patients (receveur) ou Témoins (donneur EFS) → PBMC

Patients (receveur) → CEB

Témoins (bronche de donneur d'organe) → CEB

LCL (CPA professionnelle) → Banque

Prolifération des lymphocytes T via mesure de thymidine [3H]

Résultats

Populations

Patients

- ✓ 35 patients (2011 – 2014)
- ✓ Taux de réussite de culture: 80% (73% chez patients stables, 93% chez patients SBO, p=0,17)

Témoins

- ✓ 25 témoins (explants trachée – bronches souches)
- ✓ Mise en culture après digestion enzymatique (n=25) +/- associée à biopsie distale (n=8)

Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude selon leur statut stable ou SBO

	Patients en SBO (n=13)	Patients stables (n=22)	p
Age	59,46 ± 2,4	57,77 ± 3,56	0,54
Sexe			
- Homme	7	14	0,58
- Femme	6	8	
Délai entre transplantation et prélèvement (mois)	40 ± 13	24 ± 3	0,003
Type de greffe			
- MFG	5	11	0,45
- BP	3	6	
Dose de prednisone	9,34 ± 3,96	11,45 ± 3,71	0,07
Anti-calculéurine			
- Tacrolimus	11	20	0,58
- Ciclosporine	2	3	
Résiduelle Tacrolimus*	5,27 ± 0,81	6,29 ± 0,81	0,47
Métabolite Ciclosporine*	1166	1113,5	0,85
PCR CMV (LBA) positive/négative*	6/7	3/16	0,046
PCR HSV (LBA) positive/négative*	3/3	6/9	0,6
PCR multiples (LBA) positive/négative*	4/6	6/11	0,82
Bactériologie (LBA) positive/négative*	4/7	5/11	0,91
Mycologie (LBA) positive/négative*	5/8	7/10	0,89

Expression d'HLA-G soluble et membranaire

- ✓ concentration plasmatique moyenne: 12,28 ± 6,63 pg/mL (n=16 patients)
- ✓ concentration moyenne dans le LBA: 1,13 ± 0,53 pg/mL (n=16 patients)
- ✓ Absence de détection dans le surnageant (n=33 patients et témoins)
- ✓ Immunomarquage positif chez un patient (cellules alvéolaires) et un patient (CEB)

La CEB inhibe fortement l'alloprolifération T en MLR

La CEB inhibe significativement la prolifération lymphocytaire T

- Chez les témoins
- Chez les patients
- Avec un effet « dose-réponse » chez les témoins

Les MLR ont été réalisées sans CEB (PBMC: LCL valeur de référence, barre noire) puis en présence de concentrations croissantes de CEB de sujets témoins (rapports respectifs de CEB de 0,05 (barre blanche) ; 0,1 (barre quadrillée) et 0,25 (barre rayée) pour 1 PBMC et 0,5 LCL)

Stables (n=6)

SBO (n=16)

La capacité d'inhibition des CEB est diminuée chez les greffés stables vs témoins (26%, p=0,01)

La capacité d'inhibition des CEB est similaire chez les greffés en SBO vs témoins (62%, p=0,46)

L'inhibition de prolifération de la CEB nécessite un facteur soluble

En MLR (patients et témoins)

- ✓ L'ajout de surnageant inhibe fortement la prolifération lymphocytaire T
- ✓ Tendance à un pouvoir immunosuppresseur supérieur du surnageant comparativement aux CEB

La neutralisation de:

- TGF-β
- IL-10
- HLA-G
- ILT2
- ILT4
- PGE2

Montre une restauration significative de la prolifération inhibée par les CEB via TGF-β, IL-10 et ILT4.

Profil cytokinique du surnageant de CEB modifié chez le greffé

	Témoins (n=14)	Patients (n=10)	p
GM-CSF	26,69 ± 4,38	30,39 ± 8,85	0,84
IFN-γ	4,10 ± 1,29	0,70 ± 0,20	0,0001*
IL-6	0,65 ± 0,15	0,48 ± 0,07	0,06
MDC	5,22 ± 1,11	2,14 ± 0,38	0,031*
IL-10	1,96 ± 0,90	0,64 ± 0,19	0,01
IL-17A	1,24 ± 0,23	0,41 ± 0,06	0,002*
IL-18	1,07 ± 0,29	0,19 ± 0,07	0,77
IL-2	0,47 ± 0,06	0,31 ± 0,05	0,06
IL-4	1,95 ± 0,40	2,68 ± 0,37	0,0001*
IL-4	53,70 ± 14,19	106,80 ± 34,42	0,08
IL-6	597,50 ± 302,94	465,00 ± 103,30	0,49
IP-10	27,71 ± 7,79	9,22 ± 2,16	0,03
MCP-1	0,36 ± 0,06	3,20 ± 0,91	0,04
RANTES	3,62 ± 0,75	1,89 ± 0,40	0,09
TNF-α	1,92 ± 0,74	0,94 ± 0,25	0,66
IL-20	18,96 ± 0,23	17,68 ± 0,43	0,12

Chez le greffé: Expression augmentée d'IL-4 et diminuée d'IFN-γ, MDC, IL-17A

Conclusions et perspectives

- La CEB humaine est un élément clé de l'immunomodulation locale via son interaction inhibitrice avec le LyT.
- Après TxP, sa capacité immunosuppressive sur les cellules T est significativement diminuée, mais lors du SBO, son action inhibitrice est comparable à celle de CEB témoins pré-transplantation. Cette dysrégulation pourrait participer à l'initiation du processus des lésions de SBO en abaissant le seuil de contrôle de l'alloréactivité et en autorisant une activation lymphocytaire T.
- IL-10, TGF-β, HLA-G via ILT4 semblent impliqués dans la médiation de l'immunosuppression de la CEB.
- D'autres cytokines du microenvironnement pourraient jouer un rôle dans la perte d'inhibition de la CEB observée chez les greffés stables (diminution d'IL-17A), et IFN-γ, augmentation d'IL-4).

Etude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B au cours du rejet chronique humoral d'allogreffe (Sophie HILLION)

La transplantation est le traitement de choix pour remplacer un organe ou un tissu dont le fonctionnement est définitivement altéré. En transplantation humaine, l'induction d'une tolérance à une allogreffe est donc devenue l'objectif majeur. Les rejets hyperaigus et aigus sont des phénomènes bien contrôlés par les immunosuppresseurs, mais à ce jour, il n'existe aucun médicament permettant de contrôler efficacement le rejet chronique humoral (RHC). Bien que les lymphocytes T (LT) peuvent être considérés comme des acteurs clés de la reconnaissance allogénique aboutissant à la destruction du greffon, les LB (effecteurs de la réponse humorale) pourraient jouer un rôle sous-estimé et mal connu dans la réponse allogénique. Il semble désormais acquis que les LB jouent un rôle central dans le développement et le contrôle de l'immunité. Les LB peuvent agir par exemple comme cellules présentatrices d'antigène dans l'activation des LT CD4 et T CD8. Il a même été proposé récemment l'existence d'une catégorie de cellules B régulatrices productrices d'IL10 qui pourraient, à l'instar des cellules T régulatrices CD4+CD25+, réguler les différents phénomènes immuns et auto immuns. Enfin, de récents arguments tendent à montrer le rôle crucial des LB dans l'induction du phénomène de tolérance au niveau des LT périphériques ouvrant ainsi une nouvelle voie de recherche dans l'étude de la réponse allogénique.

Notre objectif est d'étudier phénotypiquement et fonctionnellement les LB des patients transplantés rénaux ayant développé un rejet humoral chronique mais aussi chez ceux ne présentant que des anticorps anti-greffon sans signes histologiques de rejet. Après une étude préliminaire monocentrique, nous souhaitons étendre notre analyse à une étude multicentrique dans le cadre du réseau René Spiesser.

L'analyse phénotypique fine multi-paramétrique sera réalisée par cytofluorométrie (12 paramètres) chez les différents groupes de patients afin d'étudier la distribution des diverses populations de LB matures circulants. A cette analyse descriptive sera associée une analyse fonctionnelle de l'activité régulatrice des LB à l'aide d'un modèle de coculture cherchant à évaluer le potentiel régulateur des LB sur la fonction T (prolifération, production de cytokines TH1...). Nous avons d'ores et déjà montré que cette activité régulatrice pouvait s'avérer déficiente au cours du RHC. Aussi dans un 3e temps, après confirmation de ces résultats, nous chercherons à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces fonctions immuno-régulatrices.

Par cette évaluation de la fonction des LB au cours de la physiopathologie du RHC nous espérons mettre en évidence un nouvel outil diagnostique et/ou pronostic mais également permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques mieux adaptés au traitement du RHC.

Publication :

Nouël A, Ségalen I, Jamin C, Doucet L, Caillard S, Renaudineau Y, et al. B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney International*. 1 mars 2014;85(3):590-9.

Ingénierie cellulaire osseuse : impact des cellules souches mésenchymateuses et monocytes d'origine syngénique ou allogénique (Pierre LAYROLLE)

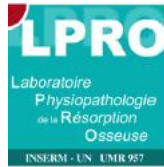
Le tissu osseux est le tissu le plus greffé chez l'homme avec 2 millions d'interventions pratiquées par an en Europe. La greffe d'os autologue est actuellement indiquée dans les pertes de substances osseuses d'origines diverses telles que la traumatologie, les tumeurs, l'infectiologie ou les reprises de prothèses complexes. Cette technique reste le gold standard mais est limitée en quantité et conduit à des complications sur le site de prélèvement. Les greffes d'os allogéniques sont également utilisées, souvent en 2^{ème} intention, mais posent les problèmes liés aux contraintes d'une banque de tissu, de contamination infectieuse et de rejet immunologique. La dernière alternative qui s'impose progressivement est l'ingénierie tissulaire. Elle consiste à cultiver des cellules souches mésenchymateuses (CSM) humaines sur des biomatériaux synthétiques afin de leur conférer des propriétés ostéogéniques. Dans cette nouvelle approche thérapeutique, les CSM sont isolées à partir d'un prélèvement de moelle osseuse autologue et associées à un biomatériau de type biocéramique phosphocalcique. Cependant, la greffe de cellules allogéniques serait une avancée majeure en simplifiant les étapes de culture, de logistique et de contrôle qualité des lots cliniques. Un autre type de cellule, le macrophage, est impliqué dans les processus d'ossification. Pendant une phase inflammatoire, un dialogue s'établit précocement entre les macrophages et les CSM afin de soutenir la formation osseuse tout en limitant les réponses inflammatoires et immunitaires trop délétères. Ces communications entre CSM, macrophages et autres cellules du système immunitaire (lymphocytes T et B) sont cependant complexes et des études précliniques doivent être menées dans ce domaine.

Ce projet vise à étudier l'impact des cellules souches mésenchymateuses et des monocytes d'origine syngénique ou allogénique dans l'ostéogénèse. L'originalité réside tout d'abord dans la comparaison de greffes de CSM syngéniques et allogéniques pour la régénération osseuse chez la souris, étape pré-clinique indispensable avant des essais chez l'homme. Pour cela, des CSM de souris C57BL/6 seront associés à des BCP (particules de phosphate de calcium biphasé) et implantées soit à des souris CD57BL/6 consanguines (modèle syngénique), soit à des souris BALB/c (modèle allogénique). Ces implants seront réalisés tout d'abord en site sous-cutané ectopique puis en site osseux dans un défaut de taille critique réalisé dans la calvaria des souris. De plus, ce projet s'attachera à mieux comprendre l'impact de l'inflammation / immunité, et plus particulièrement des monocytes/macrophages, sur les processus de régénération osseuse. Les réponses immunes et dialogues entre MSC et cellules immunitaires (inflammation, éventuel réaction de l'hôte contre le greffon) seront étudiés par immunohistochimie et RT-PCR quantitative. L'impact spécifique des monocytes / macrophages sur la formation osseuse sera analysé suite à l'injection de ces cellules dans un contexte syngénique ou allogénique.

Brevet :

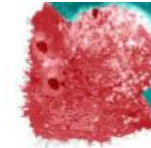
Gamblin A-L, Trichet V, Layrolle P. Bone regenerating biomaterials with selected cells from peripheral blood [Internet]. EP2974753A1, 2016

Poster

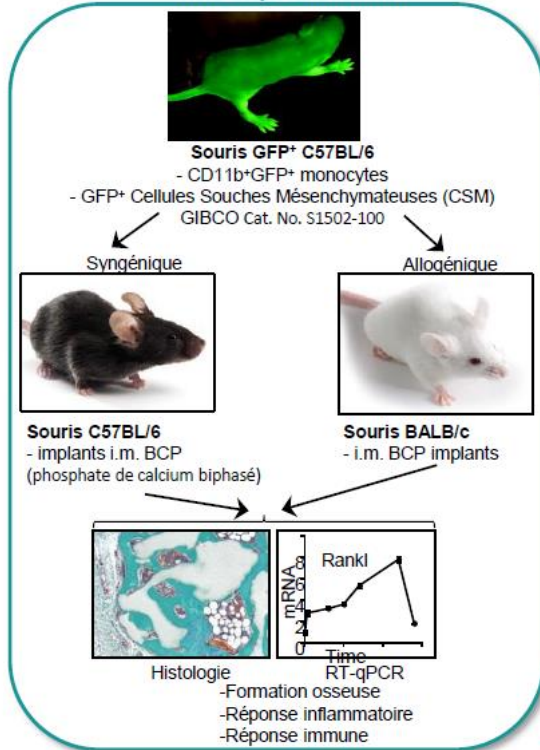


Ingénierie cellulaire osseuse : impact des cellules souches mésenchymateuses et monocytes d'origine syngénique ou allogénique

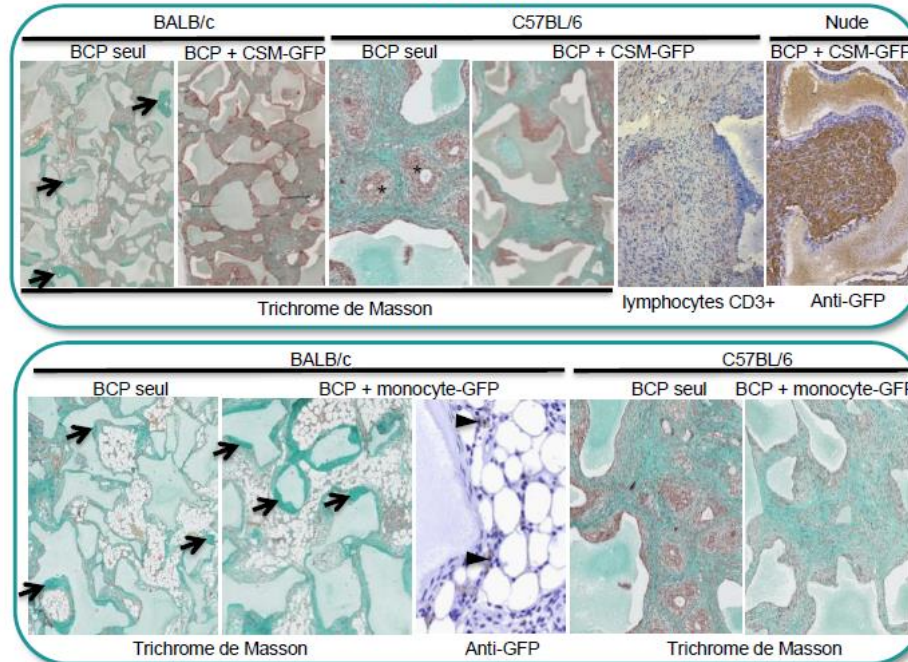
INSERM - UN UMR 957



Plan expérimental



Résultats



Conclusions

Nos résultats montrent que :

- l'ostéoinduction avec les BCP seuls (flèches) est différente selon la souche de souris (BALB/c vs C57BL/6), en lien avec une réaction inflammatoire chronique délétère (*);
- les CSM achetées chez Gibco représentent une véritable lignée « tumorale » qui empêche tout mécanisme de formation osseuse (développement tumoral dans les souris Nude);
- l'implantation de monocytes CD11b⁺ de la moelle osseuse ne modifie pas la formation osseuse en condition allogénique et ne l'induit pas en condition syngénique;
- la présence de lymphocytes T CD3⁺ dans les implants des souris immunocompétentes pourrait avoir empêché les augmentations de formation osseuse attendues. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Implant / donneur	Receveur		
	nude	BALB/c	C57BL/6
BCP seul	+	+	-
+ CSM humaines	++	ND	ND
+ Monocytes humains	++	ND	ND
+ CSM C57BL/6 « tumorales »	-	-	-
+ Monocytes C57BL/6	ND	+	-

Pathogénèse du syndrome néphrotique à hyalinose segmentaire et focale : rôle de Lin-2/CASK dans la récurrence après transplantation rénale (Hanz Christian LORENZO)

Le Syndrome néphrotique par hyalinose segmentaire et focale (HSF), dans sa forme cortico-résistante, conduit au stade terminal d'insuffisance rénale dans les 3 à 7 ans. Même après la transplantation rénale, la maladie peut réapparaître très rapidement suggérant une origine systémique. La présence dans le sérum d'un facteur circulant qui déstabilise la barrière de filtration glomérulaire a été évoquée, cependant son identité reste inconnue. La plasmaphérese ainsi que l'immunoabsorption sur colonnes de protéine A ont montré leur efficacité à réduire la protéinurie en éliminant ce facteur inconnu. **Nous avons identifié par spectroscopie de masse la présence de CASK** (Calcium/calmodulin-serine protein kinase dépendante) dans les sérums de patients HSF après immunoabsorption sur colonne de protéine A. CASK est une « pseudokinase » importante pour le maintien de la polarisation cellulaire au niveau des podocytes (cellules qui s'intègrent dans la barrière de filtration). Récemment, il a été démontré également sa présence dans l'espace extracellulaire.

Nous démontrons dans notre travail que CASK est capable d'induire les altérations typiques de la pathologie au niveau *in vitro*, mais aussi *in vivo* : délocalisation de ZO-1 dans les jonctions des cellules, réorganisation de fibres d'actine, relocalisation de synaptopodine ou l'effacement des pédicelles. L'expression finale de ces altérations consiste dans l'apparition d'une protéinurie bien avérée. Nous avons aussi identifié CD98 comme récepteur de CASK à la membrane podocytaire et observé que CASK/CD98 induit l'activation d'Akt, ERK, NF- κ B et c-mip. **C'est la première fois que ce complexe est à l'étude.**

La suite de nos recherches comprend :

- 1) Développer un test ELISA pour la détection de la maladie.
- 2) Approfondissement dans l'étude des altérations podocytaires au cours de la maladie.
- 3) La signalisation induite par CASK dans les podocytes.
- 4) Etude de l'origine du CASK dans le sérum (sécrétion lymphocytaire?).
- 5) Développement d'un modèle de souris transgéniques pour l'étude *in vivo* chez la souris (reproductibilité de la maladie).
- 6) Caractérisation du complexe CASK/CD98 à des buts thérapeutiques.

Détection in situ d'anticorps allogéniques anti-HLA spécifiques du donneur chez les transplantés cardiaques ou pulmonaires (Jean-Luc TAUPIN)

Objectifs. En greffe d'organe, l'allo-immunisation est mise en évidence par la recherche dans le sérum du receveur d'anticorps anti-HLA du donneur (DSA pour Donor-Specific Antibody). Récemment s'est généralisée l'utilisation de techniques très sensibles (dites « Luminex ») et très résolutive (format « single antigen »), permettant de détecter de très faibles quantités d'anticorps d'isotype IgG et de préciser la cible antigénique avec une précision allélique. Leurs performances permettent d'envisager leur utilisation dans d'autres milieux biologiques, et notamment l'organe lui-même, à partir de fragments de biopsies, échantillons dont la petitesse requiert une méthode d'analyse très sensible. Nous avons récemment utilisé cette approche pour montrer chez des transplantés rénaux la supériorité de la biopsie par rapport au sérum pour préciser la gravité de la réponse humorale anti-greffon (Bachelet et coll, article soumis pour publication). Nous souhaitons adapter cette procédure aux greffes d'organes thoraciques (cœur et poumon), pour lesquelles les connaissances quant au rôle pathogène des allo-anticorps sont moindres, et pour lesquelles la biopsie est pratiquée de façon beaucoup plus régulière et fréquente.

Résultats attendus. La détection directe in situ de DSA, ainsi que la comparaison pour la biopsie des critères histologiques et de la recherche de dépôts de complément (C4d), avec la recherche classique de DSA dans le sérum, permettront de préciser si la biopsie est plus performante pour la mise en évidence de DSA IgG, capables ou non d'activer le complément par la variante C1q. Le relevé des données histologiques, et de l'état clinique des patients au moment de la biopsie et à distance permettront de préciser l'intérêt diagnostique de ce test et si la détection de DSA dans la biopsie peut prédire l'évolution de la fonction du greffon. Les échantillons antérieurs disponibles seront aussi analysés pour définir si l'étude in situ permet de détecter de façon plus précoce l'apparition de DSA que le sérum.

Méthodologie. 39 et 36 patients ont reçu un greffon pulmonaire ou cardiaque au CHU de Bordeaux de 2009 à 2011, conservé un organe fonctionnel plus de un an, et 10 ont développé un DSA dans les 2 ans. De plus, parmi les greffés de 1998 et 2008, 34 ont développé des DSA, explorés dans le sérum à partir de 2009, et pour lesquels des fragments de biopsie reliquats des analyses histologiques ont été congelés. Ils seront utilisés pour l'étude in situ des anticorps anti-HLA. Les biopsies prélevées à 1 an et 2 ans post-greffe seront étudiées comparativement au sérum du même jour. L'éluat est réalisée en milieu acide, puis après neutralisation en milieu alcalin, l'éluat est soumis à l'étude en « single antigen » à la recherche de DSA. Les éluats de biopsies trouvés positifs en « single antigen » seront ensuite analysés en test C1q, une variante du test « single antigen » qui permet de définir la capacité des anticorps à activer le complément.

Publication :

Visentin J, Chartier A, Massara L, Linares G, Guidicelli G, Blanchard E, et al. Lung intragraft donor-specific antibodies as a risk factor for graft loss. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1 déc 2016;35(12):1418-26.

Rôle des récepteurs purinergiques dans l'activation des cellules dendritiques au cours des lésions d'ischémie-reperfusion du greffon cardiaque (CardioDC) (Denis ANGOULVANT)

Le phénomène d'ischémie-reperfusion myocardique constitue un évènement inéluctable en transplantation cardiaque, à l'origine de lésions majeures et irréversibles du greffon. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe aucun agent thérapeutique validé pour la prévention ou le traitement des lésions d'ischémie-reperfusion. Ces lésions sont, très largement, le résultat de l'activation des cellules du système immunitaire et de la réponse inflammatoire induite. En effet, la séquence d'ischémie-reperfusion expose le greffon à un stress cellulaire associé à une nécrose, entraînant la libération de signaux de danger. Ces signaux peuvent activer les cellules du système immunitaire inné, initiant ainsi une réponse inflammatoire stérile. En particulier, les cellules dendritiques ont été montrées comme impliquées dans les lésions d'ischémie-reperfusion. Cependant, les types cellulaires et les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets restent à déterminer.

Au cours du projet CardioDC, qui a débuté en janvier 2012, nous avons pu montrer que les cardiomyocytes stressés par une séquence d'ischémie-reperfusion libéraient des signaux de danger dans le milieu extracellulaire, à l'origine de la maturation et de la migration des cellules dendritiques humaines. De plus, nous avons montré que 40 % de l'activation observée était médiée par les récepteurs purinergiques. Ces récepteurs, stimulés par les nucléotides extracellulaires, dont l'ATP, présentent un rôle important dans les fonctions des cellules immunitaires en condition physiopathologique.

Objectifs : L'objectif de ce projet est d'identifier de nouvelles cibles, dont la modulation pharmacologique pourrait permettre de prévenir les lésions d'ischémie-reperfusion du greffon myocardique lors de son implantation. Grâce à des techniques de patch clamp et de spectrofluorimétrie calcique, nous discriminerons le ou les récepteurs purinergiques impliqués l'activation des cellules dendritiques. Puis, en utilisant une approche d'inhibition pharmacologique (antagonistes) et moléculaire (siRNA) sur un modèle *in vitro* de co-culture cellulaire soumise à une ischémie-reperfusion simulé, nous nous proposons d'étudier l'effet de la modulation de ce récepteur purinergique chez les cellules dendritiques dans la survie des cardiomyocytes. Enfin, nous confirmerons le rôle de ce récepteur dans les lésions d'ischémie-reperfusion *in vivo*, sur un modèle de transplantation cardiaque hétérotopique chez la souris WT/KO pour le récepteur purinergique identifié.

Résultats attendus : Nous attendons de cette approche l'identification du récepteur impliqué dans la différenciation des cellules dendritiques vers un profil pro-inflammatoire lors du stress d'ischémie-reperfusion myocardique. Cette étude devrait nous permettre d'identifier une nouvelle cible moléculaire permettant, à terme, un transfert à la clinique avec le développement d'un anticorps thérapeutique à visée préventive contre les lésions d'ischémie-reperfusion myocardique, en transplantation cardiaque.

Méthodologie : Le projet CardioDC est un projet composé de 3 parties. Les deux premières parties du projet seront consacrées à l'identification du récepteur purinergique impliqué dans l'activation des cellules dendritiques (Partie 1) et à l'étude de son rôle dans la survie des cardiomyocytes (Partie 2). Ces parties seront réalisées sur un modèle de co-culture cardiomyocytes/cellules dendritiques. Les cellules dendritiques provenant de la co-culture seront ensuite prélevées et utilisées en réaction mixte lymphocytaire, afin d'étudier leur capacité à activer les lymphocytes T naïfs. La 3^e partie du projet consistera à confirmer le rôle du récepteur purinergique identifié dans les lésions d'ischémie-reperfusion chez la souris (WT et KO pour le récepteur identifié), dans un modèle de transplantation cardiaque (Partie 3).

Publication :

Chadet S, Ivanes F, Benoist L, Salmon-Gandonnière C, Guibon R, Velge-Roussel F, et al. Hypoxia/Reoxygenation Inhibits P2Y11 Receptor Expression and Its Immunosuppressive Activity in Human Dendritic Cells. *J Immunol.* 15 juill 2015;195(2):651-60.

Personnes issues de l'immigration à Marseille et Enrichissement de la banque de sang placentaire (Julie DI CRISTOFARO)

Les greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques utilisent des greffons obtenus de donneurs apparentés ou non apparentés, prélevés par aphérèse au décours d'un traitement de mobilisation, par ponctions multiples des crêtes iliaques sous anesthésie générale, ou collectés après la naissance d'un enfant en bonne santé par ponction des veines ombilicales et recueil du sang placentaire.

Les registres de donneurs volontaires non apparentés et les banques de sangs placentaires répertorient une fréquence élevée de phénotype HLA caractéristiques des populations Européennes ; la conséquence en est la difficulté d'identifier un donneur HLA compatible ou même une Unité de Sang Placentaire totalement ou partiellement compatible pour les patients issus de communautés autres que d'ascendance Européenne, ce qui soulève une question éthique et politique d'égalité dans les accès aux soins.

A l'intérieur même des populations dites caucasienne, des différences significatives existent dans la fréquence des allèles et des haplotypes HLA, en fonction de la région géographique au sein de laquelle le registre (« centre donneur ») ou la banque de sangs placentaires sont implantés. Un des objectifs actuels de l'Agence de la Biomédecine et du Réseau Français du Sang Placentaire (RFSP) est d'augmenter le nombre, la qualité (en terme de nombre de cellules totales et de cellules souches), mais aussi la diversité génétique des USP collectées et conservées par les banques de sang placentaires Françaises : pour cette raison, de nouvelles banques ont récemment été créées, en association avec leurs maternités de proximité ; la banque de sangs placentaires de Marseille a redémarré son activité arrêtée en 2003, avec l'objectif de tirer avantage du bassin métropolitain marseillais enrichi de diverses vagues de migrations pour contribuer tout particulièrement à l'objectif de diversité génétique accrue.

Au-delà des aspects médicaux et biologiques, le recrutement de diverses communautés héritières de comportements sociaux, culturels et religieux différents, soulèvent les questions de l'organisation et de l'acceptation du don. Le premier objectif de ce projet est de définir des zones d'origine géographique qui montrent un intérêt dans l'enrichissement qualitatif des registres et d'évaluer la pertinence des critères de qualification des UPS en fonction de ces zones géographiques. L'origine ancestrale des donneuses sera évaluée par le recueil du lieu de naissance des grands parents.

Le second objectif, sociologique, est de construire les messages et les actions les plus adaptés et les plus pertinents pour améliorer le recrutement des populations les plus intéressantes en termes d'enrichissement des registres et de qualification des USP. Des entretiens qualitatifs (focus-group) permettront de définir leurs attentes en termes de communication et d'information.

Ce projet propose également d'explorer les aspects éthiques et juridiques quant à la législation des activités de banking en lien avec l'origine géographique, comme la nationalité ou la langue pratiquée, la sélection des donneuses sur la base de leur origine géographique ou encore la pertinence et la faisabilité de faire évoluer les pratiques de banking et dans le cadre de la coopération internationale en particulier en région Méditerranéenne.

Publication :

Bordoni C, Magalon J, Gilbertas C, Gannerre M, Le Coz P, Berthomieu M, et al. Cord blood collection and banking from a population with highly diverse geographic origins increase HLA diversity in the registry and do not lower the proportion of validated cord blood units: experience of the Marseille cord blood bank. *Bone Marrow Transplantation*. avr 2015;50(4):531-5.

Posters

Geographic origin and registry enrichment are not correlated with CBU qualification criteria in Marseilles Cord Blood Bank

C. Bordoni ¹, J. Magalon ², C. Gilbertas ³, M. Gannerre ³, M. Berthomieu ⁴, C. Chabannon ⁴, J. Di Cristofaro ¹, C. Picard ^{1,2}

¹UMR7268 ADES AMU CNRS EFS, Marseille, France; ²Immunogenetic laboratory, Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée, France; ³Birth Clinic, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France; ⁴Cell Therapy Facility, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

Introduction

Besides Cord Blood Unit (CBU) cell content, a central issue of CBU banking raised by many authors is the registry HLA diversity enrichment. This implies that CBU should be collected in maternities characterized by diversified geographic origins of pregnant women. A previous study conducted on 328 CBU in the Marseille maternity showed that 60% had at least one non-European origin and that 92% and 59% enriched the CBU and the bone marrow databases. No difference was observed for qualification standards (volume, CNT and CD34+) whatever the registry enrichment or the haplotype origin. However, several American CBU bank studies suggested that ethnicity affect the proportion of CBU with high cell numbers.

The aim of our study is to address whether in our local context, geographic origin and registry enrichment are correlated with CBU qualification criteria.

Population studied

The study, conducted in the Marseille maternity between March 2012 and August 2013, included :
 106 disqualified CBU (dCBU) with a TNC count < 140x10⁷,
 136 qualified CBU,
 2691 unrelated donors from the same geographical area
 The volumes of CBUs (mL) were recorded at the birth clinic. TNC counting was performed on CBU before processing and freezing using a hematology analyzer

Putative haplotype origin

Generic resolution HLA-A, HLA-B and allelic resolution HLA-DRB1 genotyping were performed.
 To deduce information on the ancestry of newly banked CBUs and dCBUs to increasing HLA diversity, we applied an algorithm that allows determination of parents putative haplotypes.
 The origin of CBU and dCBU was deduced by confronting their haplotype to data available and published by Maier and colleagues in 2007.

Registry enrichment

The enrichment of international UD and CBU registries was assessed using the Bone Marrow Donor Worldwide database and simulating a search for a potential recipient. A CBU was considered as enriching the registry with a nonreferenced phenotype when no 6/6 matched CBU or UD was identified in the respective registries, considering generic resolution for HLA-A, HLA-B and allelic resolution for HLA-DRB1.

Results

71% dCBU and 75% CBU presented 2 non-European haplotypes.
 dCBU and CBU enriched the CBU and the bone marrow registers in the same proportion (73.6% and 26.5% vs 62.5% and 24.3%, respectively, p=NS).
 No statistical difference was observed for qualification criteria between all dCBU presenting 2 European origin haplotype and presenting at least one non-European haplotype and in CBU registry enrichment or not.

dCBU	CBU registry				geographic origin					
	enrichment (78)		no-enrichment (28)		2 europeans (18)		≥1 non-european (88)			
qualification criteria	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		
volume before freezing (mL)	88	69-145	90	70-135	83,4	69-97	90,2	69-145		
TNC count before freezing (x10 ⁷)	105	65-137	105	66-137	104	66-136	105	56-137		
TNC distribution	n	f(%)	n	f(%)	p	n	f(%)	n	f(%)	p
56-90 x10 ⁷	20	25,6	6	21	0,66	5	28	21	24	0,73
90-105	20	25,6	6	21	0,66	4	22	22	25	0,8
105-124	16	20,5	10	36	0,11	5	28	21	24	0,73
124-137	21	26,9	6	21	0,57	4	22	23	26	0,73
unknown	1	1,3	0	0		0	0	1	1,1	

Conclusion

Our study suggests that number of CBU Banked is not affected whatever the haplotype geographic origin in Marseilles, thus enhancing HLA diversity in the registry is not at the expense of UCB quality and validation rates. The local genetic context but also the collection mode use can explain the discrepancies with others studies.

Registry genetic diversity: How increasing bone marrow donor inscription in Marseille?

S. El Fergougui¹, C. Bordoni¹, O. Fettah¹, C. Blaise¹, S. Chafai¹, E. Coustaud¹, K. Slimani¹, D.K. Nguyen¹, L. Pegoraro¹, P. Lecoz¹, T. Rose², C. Fons², C. Chabannon³, C. Picard^{1,4}, J. Di Cristofaro¹

¹UMR 7268 AMU CNRS EFS, Marseille, France; ²CRET-LOG, Aix-en-Provence, France; ³Cell Therapy Facility, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; ⁴Immuno-genetics laboratory, Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée, Marseille, France

Introduction

Bone Marrow Donors Worldwide registry presents a lack of genetic diversity with an overrepresentation of North-Western European descents. This raises the question of equality of patients care access, especially in the Mediterranean area where specific Paleolithic and Neolithic migration routes converged. Furthermore, several waves of immigration with culturally and sociologically diverse populations have considerably enriched the genetics of the inhabitants in the urban area around Marseilles. Little is known about knowledge and attitude regarding bone marrow donation, especially among population from recent foreign origin. The aims of our study were to describe awareness of hematopoietic stem cells (HSC) donation in the general population of Marseilles, including individuals from ancient or recent foreign origin, and to define the most suitable message to recruit them.

Methods

Semi-directive interviews were conducted with HSC donors, blood donors and non-donors from foreign origin. These interviews focused on HSC donation knowledge, concern and motivations. They also included geographic origin statement and the interest in different kind of communication, including in foreign languages

Population studied

The study, conducted in Marseille between october 2013 and december 2013, included :

- 14 individuals with recent foreign origin,
- 13 blood donors,
- 13 professionals involved in bone marrow donation, among which
 - 3 active member of tissue and cells donation association and HSC donors
 - 10 professionals from donor center, recipient center, maternity, etc.
- 6 general physicians

Hypotheses

Our hypotheses were as follows:

- knowledge of HSC donation is weak and this constitutes the first retain to HSC donation
- the general population has a good perception of HSC donation
- the main perceptions of HSC donation are the same whatever the geographic origin is
- the main retains for HSC donation are the same whatever the geographic origin is
- there are specific waiting concerning HSC donation communication
- motivations for HSC donation are the same that those for blood donation

Results

Our results showed that HSC donation is largely unknown, including from blood donors.

When briefly informed about HSC, no difference was observed between perception, concern or motivations according to geographic origin: HSC is largely well perceived, retain was mainly the fear of the pain and/or the donor's health, and motivation was mainly altruism.

When briefly informed about HSC, blood donors responses showed that their motivation for HSC donation would be the same than for blood donation, i.e. altruism, compassion, guilty feeling, entourage being involve in blood donation family, friend, colleague).

According to these interviews, including non-donors from recent foreign origin, the most appropriate places for communication on HSC donation are university, college or workplace but not in a medical context. However, a specific communication intended for blood donors should be considered.

Conclusion

Because French pupils and students in the general course of study reflect the general population, including foreign descents, we designed two campaigns targeting school and university in Marseilles, that are currently conducted and will be evaluated in autumn 2014.

To validate the results of this preliminary qualitative study, a quantitative study is currently performed on blood donors. The aim is to confirm our hypotheses and eventually to deploy a specific communication campaign on the need of diversity in HSC donation.

Rejet humoral en transplantation intestinale : Critères diagnostiques anatomo-pathologique et profils moléculaires (Marion RABANT)

Introduction: Le rejet humoral est apparu ces dernières années comme le principal enjeu en transplantation d'organe solide. En transplantation intestinale, il existe de plus en plus d'arguments pour penser que le rejet humoral soit également une entité cliniquement pertinente, expliquant un nombre important de pertes précoces ou tardives du greffon. Cependant, les critères du diagnostic anatomo-pathologique du rejet humoral en transplantation intestinale ne sont pas clairement établis à ce jour. Les séries publiées sur le rejet humoral en transplantation intestinale sont de petite taille et parcellaires, car n'intègrent pas les informations cliniques, immunologiques et anatomopathologiques. Une meilleure connaissance du rejet humoral intestinal pourrait avoir des conséquences importantes pour la prise en charge de ces patients.

Objectif: Ce projet est centré sur l'étude du **rejet humoral (RH)** en transplantation intestinale. Nos principaux objectifs sont d'affiner les critères de diagnostic du rejet humoral sur biopsie, en étroite connexion avec les données cliniques, immunologiques, et moléculaires, d'en définir les caractéristiques évolutives, et d'étudier son pronostic à court et moyen terme.

Méthodologie: Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique incluant l'ensemble des transplantations intestinales pédiatriques réalisées à l'hôpital Necker-Enfants Malades entre le 01/07/2009 et le 31/06/2012. 21 patients seront inclus dans cette étude. Les informations cliniques relatives à la greffe et au suivi post-transplantation seront recueillies. Environ 400 biopsies intestinales, réalisées au cours du suivi de ces patients, seront relues. 1500 immunomarquages (C4d, CD68, CD3, CD20, CD34) seront réalisés sur des biopsies sélectionnées. La recherche de DSA par technique sensible (Luminex) sera réalisée sur les sérums pré-greffe, puis en post-greffe en dépistage, et aussi à la période où la biopsie suggère l'existence d'un rejet humoral. Une étude moléculaire pangénomique par puce Affymetrix sera réalisée sur des biopsies congelées, suivie d'une étude bioinformatique.

Résultats attendus : 50% des transplantés intestinaux de notre série pourraient présenter un rejet humoral au cours de l'évolution de la greffe. Ce travail permettra ainsi d'approcher l'**histoire naturelle du rejet humoral** en transplantation intestinale. 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.

Publication :

1. Rabant M, Racapé M, Petit L-M, Taupin JL, Aubert O, Bruneau J, et al. Antibody-mediated rejection in pediatric small bowel transplantation: Capillaritis is a major determinant of C4d positivity in intestinal transplant biopsies. American Journal of Transplantation [Internet]. 2018