

**Projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres 2014
« Recherche et greffe »
Résumés résultats et publications**

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
ADAM René	Le « defatting » du greffon hépatique stéatosique : du modèle animal à l'expérimentation chez l'Homme	12 000 €
ANGLICHEAU Dany	Rejet aigu humoral du greffon rénal sans anticorps anti-HLA : description et identification de nouvelles cibles antigéniques	16 000 €
BENSOUSSAN Danièle	Production de lymphocytes T anti-virus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSH : protocole clinique	25 000 €
BRESSOLLETTE-BODIN Céline	Vers de nouveaux marqueurs immunovirologiques pour le suivi des infections à polyomavirus BK en transplantation	12 000 €
BROUARD Sophie	Identification de biomarqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques de la tolérance aux allogreffes rénales chez l'homme	32 500 €
CAILLARD Sophie	Nouveaux outils diagnostiques et pronostiques des rejets humoraux en transplantation rénale : identification des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur dans le sérum et dans le greffon et analyse de leur capacité à fixer le C1q	20 000 €
CATTAN Pierre	Intérêt de l'ensemencement d'une matrice acellulaire par des cellules souches mésenchymateuses autologues pour l'ingénierie tissulaire de l'œsophage	36 000 €
DHARANCY Sébastien	Intérêt du dosage des anticorps spécifiques du donneur (DSA) et des anticorps liant le C1q du complément pour le suivi des transplantés hépatiques	24 000 €
FOUCHER Yohann	Score diagnostique de la normalité anatomo-pathologique sur les biopsies de surveillance des greffons rénaux à un an post-transplantation	12 000 €
FREMEAUX-BACCHI Véronique	Contribution de la voie alterne du complément et de sa régulation dans le rejet de greffe rénale	12 000 €
GAGNE Katia	Potentiel anti-leucémique des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon. Application en double-greffe de sang de cordon. Application en double-greffe de sang de cordon	12 000 €
GUILLENEAU Carole	Tregs CD8+ spécifiques du donneur en allo-transplantation: d'un modèle animal à une application clinique?	36 000 €
JAISSER Frederic	Le Récepteur Minéralocorticoïde Vasculaire : Acteur au cours de l'Ischémie Reperfusion et Cible Thérapeutique en Transplantation Rénale	25 000 €
LE GUELLEC Chantal	Approche métabolomique pour l'évaluation de la qualité des greffons de rein conservés sur machine de perfusion avant transplantation	12 000 €
MOONEY Nuala	Etude des mécanismes du rejet chronique des allogreffes rénales associées avec les anticorps HLA de classe II	25 000 €
MOREAU-GAUDRY François	Optimisation et sécurisation de la greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir d'iPSCs humaines	12 000 €
PORCHER Raphaël	Evaluation du bénéfice de la transplantation pulmonaire sur la survie et facteurs associés à ce bénéfice	32 500 €
SAGE Edouard	Poursuite de l'Etude pilote de la transplantation de greffons pulmonaires réhabilités en ex vivo	25 000 €

SAUCE Delphine	<u>Etude de l'immunité Natural Killer au cours des infections à CMV après transplantation pulmonaire</u>	15 000 €
THAUNAT Olivier	<u>Réponse humorale alloimmune après greffe d'îlots de Langerhans : caractéristiques et impact sur la fonction du greffon</u>	16 000 €

Thèmes de recherche :

1. Sciences humaines, juridiques, économiques et sociales, santé publique, épidémiologie et 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. Parcours de soin, modalités d'accès à la greffe, suivi des patients transplantés et des donneurs vivants
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

Le « defatting » du greffon hépatique stéatosique : du modèle animal à l'expérimentation chez l'Homme (René ADAM)

Contexte

Dix à 20% des greffons hépatiques ne peuvent être utilisés en raison d'une stéatose sévère, à l'origine d'un risque élevé de mortalité et de non fonction post-transplantation hépatique. Le développement de machines de perfusion (MP) normothermiques semble prometteur pour diminuer l'ischémie des voies biliaires sur des greffons issus de donneurs à cœur arrêté. Parallèlement, des travaux expérimentaux sur des modèles murins suggèrent qu'il est possible de réaliser un **defatting** (diminution du pourcentage de stéatose) des foies massivement stéatosiques au moyen d'un cocktail d'agents, perfusés en normothermie, capable d'induire une lipolyse rapide. Cependant, l'impact du defatting sur la fonction hépatique et les modalités de perfusion, visant à optimiser le defatting, sont inexplorés. D'autre part, la stratégie de defatting n'a pas été appliquée à des greffons hépatiques humains à ce jour.

Objectifs :

1. Explorer les possibilités de defatting sur un modèle murin.
2. Evaluer l'impact du defatting sur la fonction hépatique et optimiser les modalités de perfusion pour améliorer le defatting sur un modèle murin.
3. Appliquer la stratégie de defatting sur des greffons humains récusés pour la greffe en raison d'une stéatose sévère.

Méthodologie

Nous nous proposons de réaliser en parallèle une étude sur un modèle animal et sur des greffons récusés pour la transplantation en raison d'une stéatose sévère

Nous utiliserons une MP avec perfusion artérielle et portale normothermique, mis au point pour le petit animal. Le modèle animal utilisé sera le rat obèse homozygote de type Zucker.

Nous utiliserons après accord de l'Agence de Biomédecine, les greffons proposés à notre centre mais contre indiqués pour la greffe en raison d'une stéatose sévère (> 60%). Une MP hépatique de type *LiverAssist* sera utilisé pour perfuser dans des conditions normothermiques ces greffons.

Le transporteur d'oxygène utilisé sera du sang humain périmé fournis par la banque du sang de notre établissement.

Rejet aigu humoral du greffon rénal sans anticorps anti-HLA : description et identification de nouvelles cibles antigéniques (Dany ANGLICHEAU)

Le rejet aigu humoral (RAH) est associé à une mauvaise survie du greffon rénal. Les anticorps pathogènes sont classiquement dirigés contre les antigènes HLA du donneur (DSA). Cependant la description de RAH en l'absence de DSA suggère l'existence d'anticorps non anti-HLA, identifiés sous le nom d'anticorps anti-cellules endothéliales (AECA). Malgré la sévérité du RAH sans DSA anti-HLA, peu de données sont disponibles. Nous souhaitons mettre en place une étude nationale au cours de laquelle seront inclus tous les patients présentant un RAH dans les trois premiers mois posttransplantation en l'absence de DSA anti-HLA démontré par Luminex Single Antigen®.

L'objectif général de ce projet est de mettre en place une cohorte importante de patients ayant présentés cette entité rare. Nos objectifs spécifiques sont :

(#1) de proposer une description clinique et histologique du RAH non-HLA. Une description clinique complète sera effectuée. Une relecture centralisée des biopsies comportera une analyse histologique conventionnelle à laquelle seront associés des immunomarquages complémentaires (CD3, CD20, CD86, C4d et protéine ribosomale S6 phosphorylée comme marqueur des altérations endothéliales).

(#2) d'identifier une signature IgG associée avec le RAH sans DSA anti-HLA. L'absence de DSA sera confirmée par Luminex SA®. Une recherche d'anticorps anti-MICA, MICB et anti-AT1R sera réalisée. De nouvelles cibles antigéniques associées au RAH non-HLA seront identifiées par Protein Array®. Cette approche, qui sera réalisée sur sérums prélevés le jour de la transplantation, permet d'identifier des IgG circulantes ciblant plus de 9000 protéines natives à partir d'un seul échantillon. La présence des IgG candidates sera confirmée par ELISA.

(#3) de démontrer la pathogénicité des IgG identifiées sur des cellules endothéliales allogéniques. Une analyse *In vitro* des anticorps circulants réactifs contre des cellules endothéliales sera réalisée à partir de cultures primaires de cellules endothéliales obtenues à partir de donneurs (BioCollection INSERM N°02G55). Cette étude comportera une analyse en cytométrie de flux des cross match endothéliaux. L'analyse fonctionnelle reposera sur la caractérisation du phénotype et de la fonction endothéliale. D'autre part, la capacité de ces anticorps à activer les cellules T et NK sera étudiée.

L'identification et la caractérisation de nouvelles IgG non anti-HLA responsables de rejet aigus humoraux permettrait le développement de nouveaux outils capables de prédire la survenue de cet événement sévère, de surveiller l'efficacité du traitement et de développer des approches thérapeutiques innovantes.

Production de lymphocytes T anti-virus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSH : protocole clinique (Danièle BENSOUSSAN)

Les infections à virus d'Epstein Barr (EBV), cytomegalovirus (CMV) ou Adénovirus (ADV) représentent l'un des effets secondaires majeurs de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'incidence est variable selon le degré de compatibilité HLA et/ ou la source de CSH utilisée. Si de nombreux traitements anti-viraux sont maintenant disponibles pour le CMV, il existe un anticorps monoclonal efficace contre l'EBV (anticorps anti-CD20 : Rituximab®) ainsi qu'un anti-viral préconisé contre l'ADV (cidofovir : Vistide®). Le suivi régulier de la charge virale de ces 3 virus après allogreffe de CSH permet d'initier ces traitements de façon pré-emptive et de traiter ainsi les patients au stade d'infection, en l'absence de tout signe clinique. Cependant, leur efficacité est parfois relative en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique et l'évolution vers le stade "maladie" est particulièrement redoutée. De plus, ils ne sont pas dénués de toxicité nécessitant un arrêt prématuré du traitement ou la diminution de la dose.

En cas d'échec des traitements médicamenteux, ces infections peuvent s'avérer rapidement mortelles. L'alternative thérapeutique pouvant être alors proposée est une immunothérapie adoptive. (Feuchtinger et al, 2006, 2010, 2012, Kolb et al, 2010, Leen et al, 2006). Il s'agit de produire par une technique immunomagnétique des lymphocytes T cytotoxiques anti-viraux (CTL anti-viraux). Notre équipe a initié un protocole clinique multicentrique, actuellement en cours, consistant en la production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV (CTL anti-ADV) à partir de cellules du donneur de CSH (leukaphérèse) à l'aide d'une technique rapide de grade clinique (Cytokine Capture System et système CliniMACS de Miltenyi Biotec) afin de proposer une alternative thérapeutique aux patients en échec de traitement par cidofovir. Les résultats préliminaires nous conduisent à élargir les indications à deux autres virus responsables d'infections post-greffe et aux patients ayant reçu une allogreffe de sang placentaire.

Nous proposons un protocole pilote oligocentrique sous l'égide de la SFGM-TC, ayant pour objectif d'inclure 12 patients sur une durée maximale de 2 ans, présentant une infection à EBV ou CMV ou ADV en échec d'un traitement anti-viral conventionnel correctement mené, après une allogreffe de CSH génodentique ou non apparentée 9/10 ou 10/10ème identique ou une allogreffe de sang placentaire et chez lesquels l'immunité spécifique anti-virale spécifique n'est pas reconstituée. L'objectif principal est l'absence de toxicité et plus particulièrement de survenue d'une GVH aiguë de grade supérieur à 2 et/ou d'une GVH chronique extensive ou d'aggravation d'une GVH pré-existante dans le mois qui suit l'injection. Les objectifs secondaires sont l'évolution de la charge virale et de la reconstitution immunitaire spécifique chez le patient.

Publication :

Qian C, Wang Y, Reppel L, D'aveni M, Campidelli A, Decot V, et al. Viral-specific T-cell transfer from HSCT donor for the treatment of viral infections or diseases after HSCT. Bone Marrow Transplantation. févr 2018;53(2):114-22.

Vers de nouveaux marqueurs immunovirologiques pour le suivi des infections à polyomavirus BK en transplantation rénale (Céline BRESSOLETTE-BODIN)

Le polyomavirus BK (BKPyV) est un exemple type de virus opportuniste dont le pouvoir pathogène s'exprime notamment après transplantation rénale, puisque dans ce contexte l'infection se complique chez environ 5% des patients d'une néphropathie interstitielle secondaire. Les infections à BKPyV constituent un modèle très intéressant et encore peu exploré d'infection virale chronique, caractérisé dans certains cas par un niveau très élevé de réplication virale pendant plusieurs mois. Les facteurs viraux et de l'hôte qui déterminent l'évolution vers une infection non contrôlée sont mal connus.

Il n'existe pas à ce jour d'étude prospective explorant de façon longitudinale et systématique la réponse immunitaire antivirale chez des patients présentant ou non une réactivation à BKPyV. Le présent projet, mettant à profit une biocollection déjà constituée, se propose **d'étudier de façon complète la cinétique de la réponse immunitaire cellulaire et humorale, et d'y associer d'autres marqueurs immunovirologiques**, non seulement dans un groupe de patient ayant présenté une réactivation du BKPyV, mais également chez les patients indemnes de cette complication.

160 patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale au CHU de Nantes ont été inclus dans une première étude prospective monocentrique visant à définir l'intérêt prédictif de la mesure précoce de la réponse lymphocytaire sur la survenue d'une infection sévère à BKPyV. La biobanque est déjà constituée, et comporte une cellulothèque, une DNAtèque et des aliquots d'urines collectés à 1,2,3,6,9 et 12 mois post transplantation, une sérothèque à J0, 6 et 12 mois.

L'objectif principal de cette étude ancillaire est de **décrire l'évolution de la réponse immunitaire spécifique cellulaire et humorale** au cours de la première année suivant une transplantation de rein en fonction de la survenue ou non d'une infection à BKPyV. Les objectifs secondaires sont de **rechercher d'autres facteurs de risque immunologiques de réactivation du BKPyV** (génotype NK/KIR, HLA et du polymorphisme MICA donneur/receveur) et de **décrire le polymorphisme génétique viral** dans les gènes codant pour la protéine VP1 et la région NCCR.

L'analyse de la réponse lymphocytaire T spécifique polyfonctionnelle (IFNG, TNFa, IL2, CD107a) après stimulation par deux pools de peptides viraux (AgT et VP1) sera mesurée par cytométrie en flux, selon une méthodologie déjà validée pour l'étude princeps. L'analyse de la réponse humorale sera mesurée selon une technique développée par un des partenaires. L'analyse génotypique des récepteurs et ligands de cellules NK et des gènes viraux VP1 et NCCR seront réalisés par séquençage.

Cette étude ancillaire permettra de valoriser une biobanque déjà constituée, susceptible de fournir des informations précieuses, nouvelles et complètes sur les différents aspects de la réponse immunitaire anti BKPyV après transplantation rénale. Le principal résultat escompté est d'identifier de nouveaux biomarqueurs pouvant être pris en compte au moment de la greffe ou pendant le suivi, et permettant de moduler le rythme de surveillance de la réactivation du BKPyV et le traitement immunosuppresseur. Ces données permettraient de mieux anticiper les complications liées à cette infection opportuniste, fréquente chez le transplanté de rein, et contre laquelle il n'existe actuellement aucun traitement spécifique.

Publication :

Tonnerre P, Gérard N, Gavlovsky P-J, Mazalrey S, Hourmant M, Cheneau M-L, et al. MICA Mutant A5.1 Influences BK Polyomavirus Reactivation and Associated Nephropathy After Kidney Transplantation. J Infect Dis. 1 sept 2016;214(5):807-16.

Identification de biomarqueurs diagnostiques et de cibles thérapeutiques de la tolérance aux allogreffes rénales chez l'homme (Sophie BROUARD)

Objectifs : Ce projet de génomique intégrative vise à caractériser finement les mécanismes de régulation périphérique mis en oeuvre dans l'activation des différentes populations lymphocytaires à l'état de tolérance aux allogreffes rénales. L'identification des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, conduisant aux variations d'expression (surexpression ou sous-expression de gènes) observées à cet état, répond à cette question. La mise en évidence de ces mécanismes implique l'identification des régulateurs clés (facteurs de transcription et miARNs), l'identification du rôle de ces facteurs (cibles et fonctions), et la modélisation (statique) du réseau de régulation.

Résultats attendus : L'intégration des données « Omics » obtenues permettra la caractérisation du réseau de régulation sous-jacent à l'état de tolérance. Ce modèle nous permettra d'identifier des biomarqueurs spécifiques de la tolérance et de proposer des cibles thérapeutiques rationnelles. Ces biomarqueurs doivent permettre d'identifier, parmi les patients sous traitement immunosuppresseur, ceux qui présentent le profil de tolérance et chez lesquels on pourrait envisager un arrêt du traitement. Ces marqueurs permettraient également un meilleur suivi des patients actuellement tolérants. Ces cibles thérapeutiques doivent permettre d'induire chez les patients transplantés une tolérance du greffon en s'affranchissant des traitements immunosuppresseurs.

Méthodologie : Les facteurs de transcription spécifiques de populations lymphocytaires seront identifiés par une méta-analyse des données de transcriptome incluant des cohortes de patients tolérants. Cette étape permettra en plus d'obtenir une méta-signature de gènes stable (i.e. des biomarqueurs robustes) aux travers des études analysées, et discriminant ces patients des contrôles appariés (volontaire sains et patients transplantés stables mais sous traitement immunosuppresseur). Les miARNs d'expression dérégulée à l'état de tolérance seront identifiés par analyse *de novo* du miRNome sanguin des patients tolérants. Le rôle précis de ces facteurs régulateurs sera mis en évidence en identifiant d'une part leurs cibles directes, d'autre part les fonctions biologiques associées. L'ensemble des gènes cibles des facteurs de transcription sera identifié par le ChIP-chip appliqué aux échantillons sanguins. Les ARNs cibles des miARNs seront caractérisés par l'analyse du transcriptome de modèles cellulaires dans lesquels les miARNs étudiés seront exprimés (mimic) ou inactivés (inhibiteur). Les fonctions biologiques des cibles régulées par un même ou plusieurs facteurs régulateurs seront déduites des analyses bioinformatiques (recherche de biais significatifs d'ontologies de gènes). Le réseau de régulation sera modélisé en intégrant les données d'expression des gènes (sens de variation) à l'état de tolérance (transcriptome et miRNome), les données de régulation (interactions régulateur-cibles) sous-jacents (ChIP-chip et mimic/inhibiteur) et les annotations fonctionnelles (analyses bioinformatiques). Ce modèle permettra de prédire, en distinguant les causes (régulateur) des conséquences (cibles), l'impact fonctionnel d'une perturbation sur un des facteurs clé du réseau dont les effets seront validés biologiquement sur des modèles cellulaires *in vitro*.

Mots-clés : Tolérance aux allogreffes rénales, génomique intégrative, réseau de régulation, biomarqueur, cible thérapeutique

Publication :

Baron D, Ramstein G, Chesneau M, Echassierau Y, Pallier A, Paul C, et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney international*. 2015;87(5):984–995.

Nouveaux outils diagnostiques et pronostiques des rejets humoraux en transplantation rénale : identification des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur dans le sérum et dans le greffon et analyse de leur capacité à fixer le C1q (Sophie CAILLARD)

Bien que les anticorps (Ac) anti-HLA dirigés contre les antigènes du donneur (DSA) soient associés au rejet humoral et à un plus mauvais pronostic, la valeur prédictive de la présence d'un DSA circulant (sérum-DSA ou sDSA) pour un patient donné semble encore limitée. Des techniques récentes permettraient de mieux préciser le caractère délétère d'un DSA, soit en évaluant la capacité de fixation du complément (c1q) du DSA, soit en identifiant les DSA présents au sein du greffon rénal lui-même (gDSA). Ces deux paramètres semblent liés à une plus grande fréquence du développement de lésions histologiques agressives de rejet humoral et à une augmentation du risque de perte du greffon rénal. Enfin, les marqueurs actuels nous permettant d'évaluer l'activation de la cascade du complément au sein du greffon (C4d) sont peu sensibles alors même que ces marqueurs font partie intégrante de la dernière classification de Banff.

Notre projet consiste à rechercher et caractériser, au sein d'une population de 118 patients transplantés du rein porteurs d'un DSA issus d'une cohorte monocentrique, la présence de DSA sériques le jour de la biopsie rénale par technique Luminex Single Antigen, la présence de DSA au sein du greffon par analyse Luminex Single Antigen des éluats de greffon et leur capacité à fixer le complément (par technique Luminex Single Antigen C1q).

Ces résultats immunologiques seront confrontés à la présence et la sévérité des lésions de rejet humoral aigu ou chronique évaluées selon la classification de Banff 2009, à l'existence de signes d'activation du complément au sein du tissu rénal (marquage c4d et c5b9 en immunofluorescence) et à l'évolution de la fonction du greffon rénal (créatininémie, DFG et survie du greffon).

Nous espérons pouvoir améliorer la prédiction de l'impact de la survenue d'un DSA après transplantation rénale, en fonction de la capacité de cet anticorps à fixer le complément, l'activer, se fixer au sein du greffon et induire des lésions de rejet humoral. Dans l'avenir, la prise en charge des patients en cas d'apparition de DSA pourra être guidée par une meilleure connaissance de ces différents paramètres.



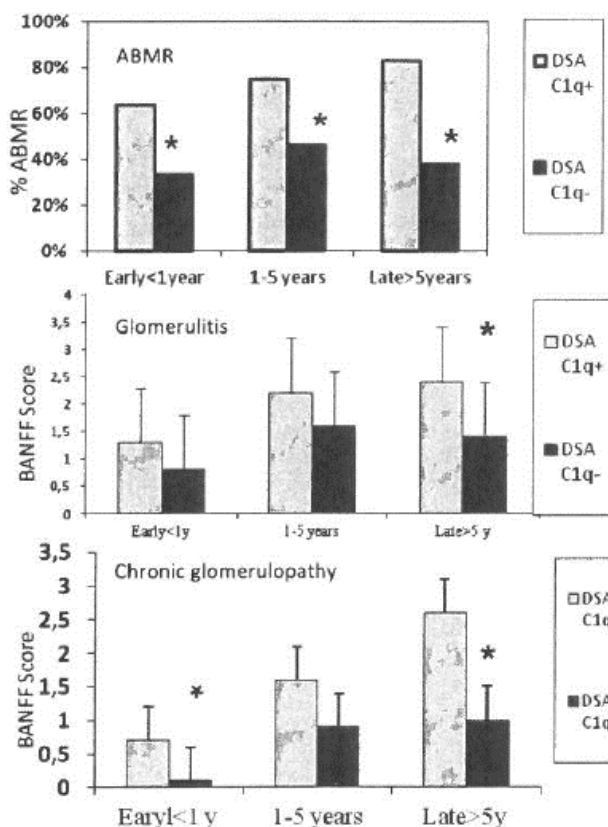
Identification and consequences of antibodies which bound C1q in 118 kidney transplant recipients with donor specific antibodies

Gabriela Vargas, Sophie Caillard, Anne Parissiadis, Jérôme Olgne, Clotilde Muller, Peggy Perrin, Laura Braun, Françoise Heibel, Christian Gachet and Bruno Moulin

Nephrology and Transplantation Unit, University Strasbourg Hospital and Strasbourg Histocompatibility Laboratory, France

Introduction Donor specific antibodies (DSA) play an important role in antibody-mediated rejection (ABMR) and graft dysfunction. Newer antibody detection assay like Luminex is highly sensitive but it is not accurately predictive of clinical outcome. A more precise characterization of DSA potentially harmful for the graft is still a matter of concern.

Patients and Methods 118 recipients (8%) among 947 adult kidney transplant followed at University Strasbourg Hospital had a functional graft and DSA in 2011. We identified and analyzed DSA by Single Antigen Beads (SAB), with the potential to activate the complement by binding C1q using a novel Luminex C1q assay. We correlate these results with the presence of ABMR, morphological features, C4d staining and graft function.



Results Median follow up of patients was 8.5 ± 6.9 years (6 m. to 35 y.). There were 65 patients sensitized before transplantation (55%). DSA identified by SAB were class II in 72% of cases. **55 patients (47%) had DSA that bound C1q (DSA C1q+)** and in 45 patients DSA were *de novo*. 80 patients underwent allograft biopsy for cause. 135 biopsies were studied: 46 done within the 1st post transplant year, 46 between 1 and 5 post transplant year and 43 after 5 years. 48 patients meet criteria for **ABMR** and in 30 cases there were CABMR. 73% of these patients had DSA C1q+. 84% of patients who didn't have ABMR had DSA C1q-. C4d staining was positive in 69% of DSA C1q+ patients and negative in 52% of DSA C1q- patients. Patients with DSA C1q+ had a poorer graft function (sCr $164 \pm 75 \mu\text{mol/l}$) compared to those with DSA C1q- (sCr $146 \pm 57 \mu\text{mol/l}$).

Conclusion DSA that bound C1q are mainly HLA class II and *de novo* DSA. Our data suggests that these DSA, as determined by a novel C1q assay, are associated with a greater risk of ABMR, severe chronic tissue injury and allograft dysfunction.

Intérêt de l'ensemencement d'une matrice acellulaire par des cellules souches mésenchymateuses autologues pour l'ingénierie tissulaire de l'œsophage (Pierre CATTAN)

Introduction: Dans le traitement des cancers et des pathologies bénignes de l'œsophage, le remplacement œsophagien par gastroplastie ou coloplastie est grevé d'une morbi-mortalité non négligeable et conduit souvent à des résultats fonctionnels imparfaits. Nous avons préalablement analysé chez le porc, la capacité d'un substitut composé d'une matrice acellulaire (SIS, Surgisis®, COOK) ensemencée de myoblastes autologues à favoriser le remodelage tissulaire vers un phénotype œsophagien. Les résultats encourageants mais imparfaits de cette étude nous conduisent à nous tourner vers un autre type cellulaire, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), cellules progénitrices non hématopoïétiques multipotentes qui constituent aujourd'hui un outil thérapeutique prometteur pour la régénération et la réparation tissulaire.

Objectif: Dans un modèle porcin, évaluer le succès du remplacement circonférentiel de l'œsophage cervical par un substitut composé d'une matrice acellulaire (SIS, Surgisis®, COOK) ensemencée de CSM autologues.

Méthodologie: Dans un premier temps, les conditions optimales d'ensemencement du SIS par les CSM seront analysées (nombre de CSM ensemencées, durée de culture des CSM sur la matrice). Seront analysés, la viabilité cellulaire, la stabilité phénotypique des CSM sur la matrice et l'architecture du substitut, à l'aide du test au MTT, de la cytométrie en flux, de la RT-qPCR, de tests de différenciation et de l'immunohistochimie. Dans un second temps, il sera réalisé un remplacement circonférentiel de 5 cm d'œsophage cervical chez 20 mini-pig, systématiquement protégé par une endoprothèse couverte extractible (Polyflex Airway Stent® - Boston Scientific). Les animaux seront répartis en 2 groupes: groupe A (n=10) : SIS ensemencée de CSM; groupe B (n=10) : SIS non ensemencée. Avant le remplacement œsophagien, l'implant tubulisé fera l'objet d'une maturation *in vivo* dans le grand épiploon pendant 14 jours. L'alimentation sera libre dès le surlendemain du remplacement œsophagien. L'endoprothèse sera retirée par voie endoscopique au 3^{ème} mois. En cas d'apparition d'une sténose au retrait de l'endoprothèse ou en cas de migration de l'endoprothèse, une nouvelle endoprothèse sera mise en place. Le succès de la procédure sera défini par la survie de l'animal à 6 mois, sans endoprothèse et sans apport nutritionnel autre qu'une alimentation orale. À partir du 3^{ème} mois, les animaux seront sacrifiés séquentiellement sur une période de 12 mois et la zone de greffe fera l'objet d'une analyse structurale et par immuno-histochimie.

Résultats attendus: 1. Chez les animaux du groupe A : restauration à 6 mois, sans endoprothèse, d'une autonomie nutritionnelle et apparition d'un phénotype œsophagien de la zone de greffe. 2. Chez les animaux du groupe B, sténose au retrait de l'endoprothèse et absence d'apparition d'un phénotype œsophagien de la zone de greffe.

Publication :

Catry J, Luong-Nguyen M, Arakelian L, Poghosyan T, Bruneval P, Domet T, et al. Circumferential Esophageal Replacement by a Tissue-engineered Substitute Using Mesenchymal Stem Cells: An Experimental Study in Mini Pigs. *Cell Transplant*. 1 déc 2017;26(12):1831-9.

Poster

Les Cellules Souches Mésenchymateuses favorisent la régénération tissulaire après remplacement circonférentiel de l'œsophage par ingénierie tissulaire

Jonathan Catry¹, Lousineh Arakelian², Patrick Bruneval³, Valérie Vanneaux², Laurent Michaud⁴, Rony Sfeir⁵, Minh Luong Nguyen¹, Thomas Domet², Jérôme Larghero², Pierre Cattan¹

1. Chirurgie Générale, Digestive et Endocrinienne, Hôpital Saint Louis, Paris ; 2. Unité de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Louis, Paris ; 3. Anatomie-Pathologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris ; 4. Gastro-Entérologie Pédiatrique, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille ; 5. Chirurgie Infantile, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille



Introduction :

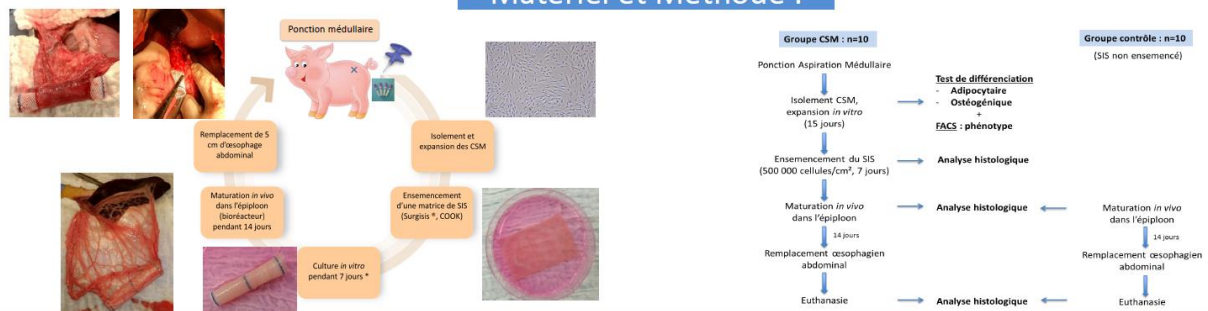
- L'ingénierie tissulaire constitue aujourd'hui l'alternative la plus prometteuse aux techniques actuelles de remplacement après œsophagectomie (gastro/colo-plastie)
- L'utilisation des Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) comme cellules d'intérêt en médecine régénérative est en plein essor de par leur multipotence, leurs propriétés pro-angiogénique, anti-inflammatoire, immuno-modulatrice et chimio-attractante particulièrement intéressantes pour la cicatrisation tissulaire.

Leur intérêt pour la régénération œsophagienne après remplacement circonférentiel n'a à notre connaissance jamais été évalué.

Objectif :

Evaluer le remodelage tissulaire vers un phénotype œsophagien après remplacement circonférentiel de l'œsophage par une matrice acellulaire ensemencée de CSM autologues, dans un modèle porcin.

Matériel et Méthode :

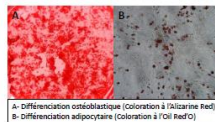
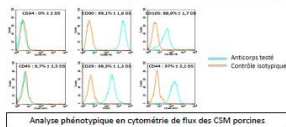


Résultats :

Caractérisation des CSM après expansion cellulaire *in vitro* :

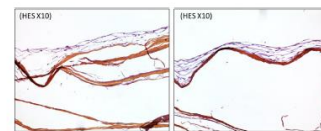
Les cellules isolées présentent les caractéristiques des CSM porcines :

- phénotype membranaire CD29+, CD44+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-
- différenciation en ostéoblaste et adipocyte)



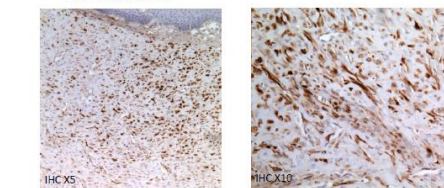
Histologie après 7 jours de culture des CSM sur le SIS *in vitro* (N=10) :

Obtention d'un revêtement uni ou pluri stratifié de CSM à la surface du SIS Sans pénétration cellulaire dans l'épaisseur de la matrice



Analyse histologique après euthanasie séquentielle des animaux :

- Ré-épithélialisation mature comparable à l'œsophage natif :
 - dès 1 mois ½ dans le groupe CSM
 - au-delà de 3 mois dans le groupe contrôle
- Régénération musculaire au sein de la zone de greffe :
 - uniquement dans le groupe CSM
 - dès 1 mois ½



Conclusion :

L'utilisation de CSM autologues lors de remplacement circonférentiel œsophagien par ingénierie tissulaire semble favoriser une ré-épithélialisation plus précoce et une régénération musculaire inexistante en leur absence.

Intérêt du dosage des anticorps spécifiques du donneur (DSA) et des anticorps liant le C1q du complément pour le suivi des transplantés hépatiques (Sébastien DHARANCY)

Introduction : Après transplantation d'organes, une recherche d'anticorps anti-HLA à 3 mois, à 1 an puis une fois par an avec des techniques sensibles est recommandée quel que soit l'organe greffé. Ce dépistage permet de détecter l'apparition d'anticorps spécifiques du donneur (DSA) ou une modification du profil d'immunisation, d'instaurer des investigations diagnostiques et de modifier l'immunosuppression. Récemment, le rôle prépondérant des DSA a été confirmé par la réduction significative de la survie du greffon rénal en cas d'association aux anticorps anti-HLA liant le C1q du complément. Bien défini après transplantation rénale, la littérature est très limitée sur le concept du rejet humoral et la signification clinique de la présence des DSA après transplantation hépatique (TH): 1) Il n'existe aucun argument spécifique diagnostique de rejet humoral après TH. En conséquence, le diagnostic est suspecté sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques, histologiques et immunologiques (DSA). 2) Les données les plus récentes établissent un lien entre la présence des anticorps anti-HLA et la dysfonction tardive du greffon. Ces résultats suggèrent la réalité de l'existence du rejet humoral après TH. Néanmoins, l'impact pronostique de la présence des Ac anti-HLA en pré-greffe est incertain. Dans une étude récente, les Ac anti-HLA en pré-TH (22% des patients) n'influençaient pas le risque de rejet et le devenir à cours terme du greffon et du receveur. En revanche, l'apparition de DSA *de novo* au décours de la TH semble être un facteur de risque de rejet, avec une diminution de la survie du greffon et du donneur. Apparaissant chez 8,1% des patients, à 1 an de la greffe, ils ciblent les antigènes HLA de classe II impliqués dans le rejet humoral.

L'objectif est d'étudier prospectivement la fréquence des anticorps anti-HLA préformés avant TH et de la fréquence et cinétique d'apparition des DSA et des anticorps anti-HLA liant le C1q *de novo* après TH. Les objectifs secondaires sont de rechercher des facteurs de risque d'apparition des DSA *de novo* et anti-HLA liés au C1q (schéma immunosuppresseurs, cause de l'hépatopathie...) et d'étudier leur impact sur la survie (greffons et patients), les épisodes de rejet, les perturbations inexpliquées du bilan hépatique et sur l'apparition de la fibrose.

Méthodologie : Tous les adultes greffés au CHRU de Lille seront inclus prospectivement dans une étude observationnelle. Le jour de la TH, ils bénéficieront d'une recherche d'Ac anti-HLA préformés. Au cours du suivi habituel, ils bénéficieront d'un dépistage de DSA et d'anti-HLA liant le C1q à entre 3 et 6 mois, 1 an et 2 ans après greffe. Le suivi ne sera pas modifié. La fibrose sera évaluée de manière non invasive par fibroscan®. Le critère de jugement principal est la positivité des DSA (ou anti-HLA), définie par une intensité de fluorescence ≥ 1000 . Les critères secondaires sont la quantification de la fluorescence et la présence d'anticorps anti-HLA liés au C1q.

Résultats attendus : intérêt des DSA dans l'identification des patients à risque d'évènements immunologiques, de dysfonction tardive et de fibrose inexpliquée du greffon

Score diagnostique de la normalité anatomo-pathologique sur les biopsies de surveillance des greffons rénaux à un an post-transplantation (Yohann FOUCHER)

Ces dernières années, les avancées à la fois chirurgicales et thérapeutiques ont permis de considérer la greffe du rein comme étant la prise en charge optimale des patients en insuffisance rénale terminale. Malgré un succès croissant des résultats de la transplantation durant les 30 dernières années notamment dans la première année de greffe, la perte chronique des greffons sur le long terme reste élevée. La prédiction précoce du pronostic à long terme d'un greffon représente donc un enjeu majeur en transplantation pour guider le choix thérapeutique qui doit être adapté au risque immunologique et non-immunologique d'un receveur donné.

Actuellement, l'analyse anatomo-pathologique d'une biopsie du transplant est l'examen le plus pertinent pour analyser la situation du greffon rénal à un instant donné et mieux évaluer son devenir.

Ainsi de nombreuses équipes de transplantation ne se contentent plus de biopsier les patients pour établir un diagnostic devant une dégradation de la fonction rénale, mais réalisent des biopsies « de surveillance » à différents temps de la transplantation. Il s'agit généralement de biopsies précoces au cours du suivi, réalisées parfois à 3 mois, le plus souvent à un an, ou moins souvent à 3 ans post-greffe. Ces biopsies ont pour objet de dépister des lésions précoces infra-cliniques (sans traduction sur la fonction rénale) mais qui vont conditionner le pronostic à moyen et long terme de la greffe.

Dans la mesure où la biopsie est un acte médical invasif, potentiellement dangereux pour le greffon et même pour le patient, il serait donc intéressant de mettre à la disposition du clinicien un outil l'aidant à prendre la décision d'éviter une biopsie de surveillance chez les patients dont la probabilité de présenter un diagnostic anatomo-pathologique normal est très importante. En effet, seules les biopsies anormales peuvent conduire le médecin à adapter la prise en charge en fonction des résultats.

L'objectif de ce projet est de construire et valider un score diagnostique de la normalité anatomo-pathologique de la biopsie des greffons rénaux chez des patients transplantés à partir de variables cliniques disponibles au moment de la greffe et au cours de la première année post-greffe. Nous excluons volontairement les biomarqueurs des variables à inclure dans un tel score, ces derniers n'étant pas mesurables en pratique quotidienne. A partir de ce score, il s'agira de définir deux groupes de patients: les patients dont le score permettrait de prédire, avec une très bonne confiance, que la biopsie de surveillance montre une histologie normale du greffon et les patients à plus fort risque de biopsie anormale.

Ce travail sera réalisé à partir de la cohorte DIVAT regroupant des patients greffés rénaux et rassemblant l'ensemble des critères cliniques et biologiques utiles à la prise en charge et au suivi médical du patient.

Publication :

Giral M, Renaudin K, Naesens M, Luning R, Anglicheau D, Morelon E, et al. The 1-year Renal Biopsy Index: a scoring system to drive biopsy indication at 1-year post-kidney transplantation. *Transplant International*

Contribution de la voie alterne du complément et de sa régulation dans le rejet de greffe rénale (Véronique FREMEAUX-BACCHI)

En transplantation d'organe, une cause importante de perte du greffon est le rejet médié par les anticorps dirigés contre les molécules HLA des cellules du donneur (DSA). Ces anticorps induisent une activation du complément par la voie classique et une inflammation endothéliale délétère pour la fonction du greffon. Les dépôts endothéliaux de C4d, témoins de l'activation de la voie classique, constituent un marqueur histologique important de rejet humoral. De plus, la capacité des DSA à lier le C1q et à activer la voie classique du complément constitue un facteur prédictif précoce et fiable permettant d'identifier les patients à haut risque de rejet de greffe. L'activation du complément conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9 et des anaphylatoxines pro inflammatoires C3a et C5a à l'origine d'une activation endothéliale et des lésions d'endothélite. Les cellules endothéliales activées constituent une surface activatrice pour la voie alterne du complément permettant alors d'amplifier une activation du complément initiée par la voie classique. L'implication de la voie alterne dans le rejet médié par anticorps n'est pas connue. Des données récentes suggèrent toutefois que des lésions endothéliales identiques à celles observées au cours du rejet médié par anticorps peuvent être mises en évidence précocement ou tardivement en post transplantation en l'absence de dépôt de C4d suggérant que l'activation de la voie classique seule ne suffit pas à générer les lésions endothéliales.

L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle de la voie alterne du complément et de ses mécanismes de régulation au cours du rejet médié par anticorps. Trois axes de recherche seront développés : 1) Evaluer l'implication de la voie alterne du complément dans l'activation des cellules endothéliales et des mécanismes d'accommodation en présence d'anticorps anti HLA dans un modèle in vitro 2) Déterminer l'influence des polymorphismes des gènes codant pour les protéines régulatrices de la voie alterne dans la perte du greffon lié à la présence d'anticorps anti-HLA 3) Etudier l'implication des haplotypes du Facteur H, de MCP et de CFHR1 dans les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de l'apparition des lésions endothéliales après une activation de la voie alterne ou classique du complément.

L'originalité de ce projet est de rechercher dans la régulation de la voie d'amplification de la voie alterne du complément de nouveaux acteurs du rejet induit par les anticorps anti HLA. Ce projet devrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs ou de nouveaux gènes de susceptibilité pour le rejet de greffe et offre l'espoir d'une nouvelle voie d'approche thérapeutique pour ces patients.

Potentiel anti-leucémique des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon. Application en double-greffe de sang de cordon. Application en double-greffe de sang de cordon (Katia GAGNE)

La greffe de sang de cordon (UCBT) est une alternative pour les patients atteints de pathologies malignes en l'absence d'un donneur HLA 10/10 identique. Chez les adultes, l'utilisation de 2 unités de sang de cordon a été développée (dUCBT) et dans la plupart des cas, seul l'un des 2 cordons contribue à l'hématopoïèse du patient. Les résultats des dUCBT sont très encourageants avec en particulier un effet bénéfique Graft-versus-Leukemia (GvL) augmenté par rapport aux sUCBT. En dUCBT, l'immaturation des cellules immunitaires des 2 unités de sang de cordon injectées permet d'accepter certaines incompatibilités HLA classe I entre les cordons et le patient. Ces incompatibilités HLA étant principalement ciblées au niveau des molécules HLA-Cw, principaux ligands des KIR, nous émettons l'hypothèse que les cellules NK KIR+ alloréactives pourraient jouer un rôle sur l'effet anti-leucémique d'autant que ces cellules sont les 1ères à réapparaître et en forte proportion en post-dUCBT. Dans le cadre d'une étude rétrospective et multicentrique (ABM APR 2011, Dr K. Gagne), nous avons évalué l'impact d'une potentielle alloréactivité des cellules NK KIR+ sur la prise d'un seul cordon. L'analyse des incompatibilités KIR/KIR ligand sur l'effectif local de dUCBT montre qu'une alloréactivité des cellules NK KIR3DL1+ dans le sens Graft-versus-Graft est bénéfique à la prise du cordon Bw4- mais augmente l'incidence de rechute post-dUCBT. Le récepteur KIR3DL1+ est exprimé au niveau des cellules NK de sang de cordon et les cellules NK KIR3DL1+ de cordon sont alloréactives contre des cibles Bw4- quel que soit leur environnement HLA d'origine. (P. Rettman et al, soumis). En parallèle, nous avons mis en évidence que la nature de l'allèle KIR3DL1 et des combinaisons d'allèles KIR3DL1/3DS1 impactent directement sur le phénotype et la fonction des cellules NK KIR3DL1+ adultes (Gagne K. et al. EJI 2013). Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons évaluer l'impact du polymorphisme allélique KIR3DL1 sur le potentiel anti-leucémique des cellules NK de sang de cordon. Ces cellules NK seront isolées à partir de prélèvements placentaires de la maternité du CHU de Nantes (Dr J. Esbelin). Le typage des allèles KIR3DL1 sera réalisé par technique de biologie moléculaire maîtrisée au laboratoire. Le potentiel de dégranulation des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon contre des lignées leucémiques standards provenant du laboratoire d'Hématologie Biologique du CHU de Nantes (Dr L. Lodé) sera évalué par cytométrie de flux. Le potentiel anti-leucémique des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon sera appréhendé en prenant en compte la nature/dose de l'allèle KIR3DL1 exprimé et l'environnement HLA autologue et sera mis en lien avec l'effet anti-leucémique des cellules NK KIR+ adultes étudié au laboratoire. A termes, cette étude doit nous permettre de dégager l'impact de certains allèles ou de combinaison d'allèles KIR3DL1 sur l'effet anti-leucémique post-dUCBT

Publications :

1. Rettman P, Willem C, Volteau C, Legrand N, Chevallier P, Lodé L, et al. Impact of Graft-versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Transplantation*. 28 oct 2016;
2. Rettman P, Malard F, Legrand N, Avinens O, Eliaou J-F, Picard C, et al. Impact of KIR/HLA genetic combinations on double umbilical cord blood transplantation outcomes. Results of a French multicentric retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and the Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI). *Bone Marrow Transplantation*. 1 nov 2016;51(11):1499-503.

Poster



POTENTIEL ANTI-LEUCEMIQUE, PHENOTYPE ET FONCTION DES CELLULES NK DE SANG DE CORDON – APPLICATION EN DOUBLE GREFFE DE SANG DE CORDON



P. Rettman¹, C. Willem¹, N. Legrand¹, J. Esbelin², L. Lodé³, P. Chevallier⁴, Retière¹ et K. Gagne¹

IRGHE



¹Laboratoire EA4271, EFS Pays de la Loire Nantes, Université de Nantes; ²Hôpital Mère-Enfant, CHU Nantes; ³Laboratoire d'Hématologie Biologique, CHU Nantes, ⁴Service d'Hématologie Clinique, CHU Nantes.

INTRODUCTION

En double-greffe de sang de cordon (dUCBT), le patient et les 2 unités de sang de cordon injectées présentent souvent certaines incompatibilités HLA classe I qui potentiellement représentent des incompatibilités en termes de KIR ligands. Les gènes KIR et HLA étant localisés sur différents chromosomes, l'appariement des gènes HLA de classe I entre donneur et receveur ne résulte pas forcément en l'appariement des gènes KIR. Ces incompatibilités KIR/KIR ligands entre cordons et patients peuvent générer une alloréactivité des cellules NK KIR⁺ qui en retour pourrait jouer un rôle sur l'effet anti-leucémique observé post-dUCBT d'autant que les cellules NK sont les 1^{ères} cellules immunocompétentes à apparaître après dUCBT et ce en très forte proportion. Dans cette étude, nos objectifs ont été d'étudier 1) l'impact des combinaisons génétiques KIR/HLA sur l'incidence de rechute post-dUCBT, 2) la reconstitution des cellules NK KIR⁺ post-dUCBT, 3) le phénotype des cellules NK de sang de cordon et 4) l'alloréactivité et la fonction anti-leucémique de ces cellules contre différentes lignées leucémiques standards.

RESULTATS

Impact des combinaisons génétiques KIR/HLA sur l'incidence de rechute post-dUCBT : Sur un effectif local de dUCBT (n=50), nous avons observé que la combinaison génétique « cordon perdant KIR3DL1⁺/cordon gagnant Bw4⁺ » augmente l'incidence de rechute post-dUCBT (Fig 1, Table 1) (Rettman P. et al. Transplantation 2016).

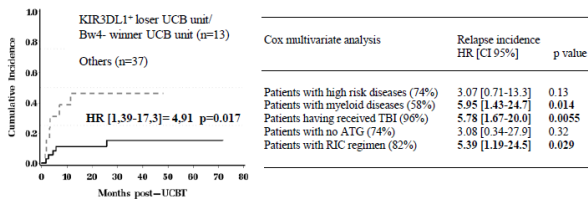


Figure 1 et Table 1: Combinaison génétique « cordon perdant KIR3DL1⁺/cordon gagnant Bw4⁺ » et incidence de rechute post-dUCBT (N=50)

Par contre, aucune combinaison génétique KIR/HLA impacte sur l'incidence de rechute sur un effectif national de dUCBT (Fig 2A, 2B) (n=293) dû à l'hétérogénéité de la cohorte (Fig 2C) et le polymorphisme des gènes KIR (Rettman P. et al. BMT 2016).

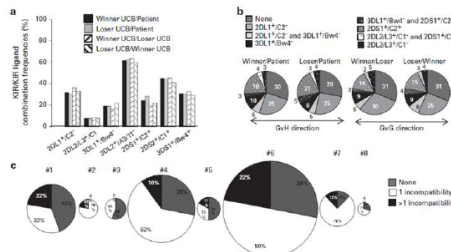


Figure 2 : Combinaisons génétiques KIR/HLA et incidence de rechute post-dUCBT (n=293)

Utilisation des gènes KIR comme marqueurs de chimérisme hématopoïétique post-dUCBT : La comparaison des profils génétiques KIR des 2 cordons et du patient pré- et post-greffe sur une cohorte locale de dUCBT (Fig 3A) a permis de définir la prise de greffe et l'identité du cordon dominant en cohérence avec les données de chimérisme obtenues à partir des marqueurs SNP (Fig 3B). Ces données génétiques KIR confortées par des données phénotypiques des cellules NK KIR⁺ post-dUCBT (Fig 3C) ont mis en évidence l'utilité des gènes KIR comme marqueurs précoces du chimérisme hématopoïétique dès J+14 post-dUCBT (Rettman P. et al. Hematologica 2015).

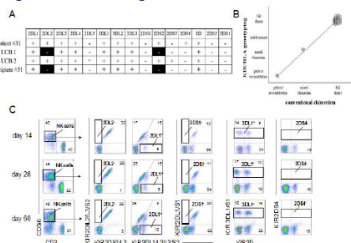


Figure 3 : Détermination précoce du chimérisme hématopoïétique post-dUCBT avec les gènes KIR

Caractérisation phénotypique des cellules NK issues de sang de cordon : La caractérisation phénotypique approfondie des cellules NK de sang de cordon nous a permis de mettre en évidence en particulier une structuration précoce du répertoire NK KIR3DL1⁺ non dépendante de l'environnement autologue HLA-Bw4 (Fig 4A) mais dépendante du contenu en gènes KIR, la présence du gène KIR3DS1 diminuant la fréquence des cellules NK KIR3DL1⁺ (Fig 4B) (Rettman P. et al. JLB 2016).

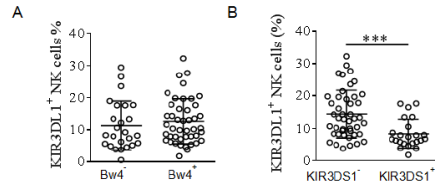


Figure 4 : Impact du génotype KIR mais pas de l'environnement autologue HLA-Bw4 sur la formation du répertoire des cellules NK KIR3D⁺ de sang de cordon

Caractérisation fonctionnelle des cellules NK de sang de cordon : La caractérisation fonctionnelle des cellules NK KIR3DL1⁺ de sang de cordon nous a permis de montrer que ces cellules sont capables de proliférer, de s'activer (Fig 5A), de dégranuler face à une cible 721.221 n'exprimant pas le ligand HLA (Fig 5B) et qu'une forte activation peut entraîner leur mort par apoptose (Fig 5C) (Rettman P. et al. Transplantation 2016).

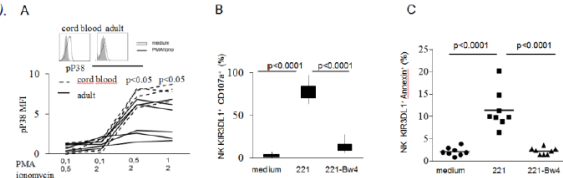


Figure 5 : Les cellules NK de sang de cordon ont des capacités d'activation et de dégranulation ex-vivo entraînant potentiellement leur mort par apoptose

Potentiel anti-leucémique des cellules NK de sang de cordon : La comparaison des fréquences des cellules NK CD107a⁺ de cordons vs cellules NK de donneurs de sang tous de génotype KIR AA montre que les cellules NK de cordon sont capables de dégranuler contre différentes lignées leucémiques présentant des niveaux d'expression HLA de classe I variables même si ce potentiel reste plus faible comparativement à des cellules NK de donneurs adultes (Fig 6). Une variabilité est observée selon les échantillons et cibles utilisées suggérant l'implication d'interactions récepteurs NK-ligands différentes.

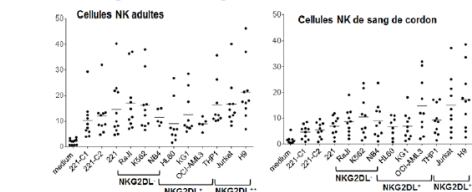


Figure 6 : Potentiel anti-leucémique des cellules NK de donneurs de sang adultes (n=11) et de cordons (n=10) de génotype KIR AA évalué en termes de fréquence de cellules NK CD107a⁺ contre différentes lignées 721.221 et lignées leucémiques

CONCLUSIONS

Sur le plan clinique, ce projet a permis d'édicter certaines règles de compatibilité KIR/HLA afin d'améliorer le devenir des dUCBT et de préconiser l'utilisation des gènes KIR comme marqueurs additionnels de chimérisme hématopoïétique post-dUCBT dès J+14. Sur le plan fondamental, ce projet a permis une caractérisation fine des cellules NK de sang de cordon et l'étude du répertoire fonctionnel NK KIR⁺.

Tregs CD8+ spécifiques du donneur en allo-transplantation: d'un modèle animal à une application clinique? (Carole GUILLONNEAU)

Objectifs :

La transplantation de rein est une thérapie essentielle dans le cadre de patients gravement atteints d'insuffisance rénale chronique. Cependant, le rejet de greffe, médié par l'activation du système immunitaire, est un frein à cette transplantation et oblige les patients à suivre un traitement lourd et provoquant de nombreux effets secondaires. Néanmoins, le système immunitaire contient également des cellules qui lorsqu'elles sont activées inhibent les cellules effectrices qui vont détruire le greffon. Il existe plusieurs types de ces cellules et le projet actuel porte sur l'analyse d'une de ces sous-populations qui est parmi les moins étudiées : les lymphocytes T régulateurs CD8+.

Les Tregs CD8+ ont été associés dans la littérature avec moins d'épisodes de rejet et même induction de la tolérance, l'absence ou la réduction de l'immunosuppression des receveurs d'une allogreffe du foie et d'intestin, de coeur et de reins. Ce projet propose d'utiliser nos connaissances de cette population en clinique avec l'utilisation des Tregs CD8+ comme thérapie cellulaire et l'utilisation de leurs marqueurs spécifiques et/ou de leurs propriétés pour la prédiction de l'évolution de la transplantation et du patient.

Méthodologie :

1) Propriétés des Tregs CD8+CD45RClow chez des volontaires sains vs patients transplantés : identification de marqueurs d'évolution des greffons.

Nous avons accès à une grande cohorte de patients transplantés présentant des évolutions différentielles de leurs greffons rénaux (DIVAT-cohorte) couplée à une biocollection (DIVAT-Biocoll). Nous allons analyser avec de nouveaux marqueurs le phénotype de la population CD8+CD45RClow pour mieux définir les Tregs parmi cette population et comparer le phénotype, le profil des cytokines, la capacité suppressive et cytotoxique, ainsi que le répertoire TCR des cellules Tregs CD8+CD45RClow chez des volontaires sains vs. des patients transplantés avant et après activation allogénique.

2) Expansion ex vivo des Tregs CD8+CD45RClow humaines et acquisition d'allo-spécificité : mise en place d'un protocole clinique.

Nous allons tester différentes conditions de culture (+/-CD40lg, # stimulation et cytokines) et évaluer l'amplification, le phénotype, la capacité de suppression et le répertoire des Tregs humaines allo-stimulées CD8+CD45RClow.

3) Evaluation préclinique du potentiel des Treg CD8+CD45RClow.

En collaboration avec une plate-forme de rongeurs humanisés, nous allons utiliser un modèle de souris humanisé NSG. Ces souris seront transplantées avec des greffes de peau humaine et recevront des cellules humaines T CD4+CD25- effectrices allogéniques (ou des PBMC totaux) +/- des Tregs CD8+CD45RClow naturels ou expansées et allospécifiques ou non. Les greffes seront analysées pour la présence de signes histopathologiques de lésions tissulaires.

Résultats attendus :

De façon générale, ce projet permettra de décrire une nouvelle population de cellules Tregs CD8+ et abordera leur rôle en transplantation humaine. Concrètement, nous espérons que ce projet permettra d'améliorer le pronostic et le diagnostic des patients avant et après transplantation d'organe et l'établissement de nouvelles stratégies d'induction de tolérance.

Brevet :

GUILLONNEAU C, ANEGON I, BEZIE S. Nouvelle sous-population de lymphocytes t régulateurs cd8 + cd45rclow et utilisations de ceux-ci. WO2017042170 A1, 2017.

Le Récepteur Minéralocorticoïde Vasculaire : Acteur au cours de l'ischémie Reperfusion et Cible Thérapeutique en Transplantation Rénale (Frédéric JAISSE)

Objectifs :

L'objectif est d'apporter un rationnel fort pour de futurs essais cliniques permettant le repositionnement des antagonistes du récepteur minéralocorticoïde (RM) à la phase aiguë de la transplantation rénale pour lutter contre les effets délétères immédiats et à long-terme de l'ischémie-reperfusion (IR) du greffon rénal (en particulier en cas de greffons obtenus à partir de donneurs limites) en utilisant :

1) **Une approche mécanistique** : Etudier l'implication du RM vasculaire, endothélial et musculaire lisse par une approche génétique utilisant des modèles murins transgéniques, invalidés sélectivement pour le RM dans le tissu endothélial (Modèle MRKO-Endothélial) et musculaire lisse (Modèle MRKO-VSM) dans l'IR. Cette approche sélective permettra de préciser le rôle du MR vasculaire dans chacun de ces types cellulaires dans la protection pharmacologique observée.

2) **Une approche pharmacologique préclinique** : Etudier les effets et la sécurité d'emploi du blocage pharmacologique du RM par l'acide canrénoïque, métabolite actif de la spironolactone – médicament déjà utilisé chez l'homme dans d'autres indications - dans un modèle préclinique, très proche de la transplantation humaine : le modèle d'autogreffe rénale chez le cochon (*le financement demandé ne couvre que cet aspect*).

Résultats attendus :

1) mettre en évidence le rôle joué par le RM vasculaire dans la physiopathologie de l'IR rénale. Cette approche améliorera notre compréhension des mécanismes mis en jeu au cours de l'IR rénale.

2) Définir si l'effet bénéfique du blocage du RM préalablement observé chez les rongeurs est transposable dans un modèle préclinique d'auto-transplantation rénale chez le cochon, en améliorant la reprise fonctionnelle et en diminuant les lésions à court et à moyen terme.

Méthodologie :

1) une IR sera réalisée par clampage bilatéral (25 min) des pédicules rénaux chez des souris mâles C57Black6 invalidées pour le gène du RM soit dans l'endothélium soit dans le muscle lisse vasculaire. Les explorations réalisées à court terme (24h) ou long terme (4 semaines) après IR permettront d'étudier la fonction rénale par la mesure de l'urée et de la créatinine plasmatiques et urinaires (cages à métabolisme), le flux sanguin dans l'artère rénale (à l'aide d'une sonde Transonic), les lésions histologiques (vacuolisation et nécrose tubulaires, fibrose), l'expression moléculaire (ARN et protéine) de marqueurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, marqueurs de polarisation des macrophages), de lésions rénales (tels que la lipocaline 2, KIM-1 et klotho), du stress oxydant et de la fibrose du parenchyme.

2) Chez des cochons de 45kg environ, le rein droit sera prélevé à J-1, perfusé et conservé dans un liquide de conservation de type UW à 4°C et autogreffé à J0. Dans le groupe traité par acide canrénoïque (Soludactone®), les animaux recevront une dose de 7 mg/kg en IV trois heures avant la néphrectomie, puis à J1 (5 min après la reperfusion) J2 et J3 de la greffe, et le liquide de perfusion et de conservation sera additionné de Soludactone® 1 mg/l. Des échantillons sanguins et urinaires seront collectés tout au long de l'expérience pour analyses biochimiques et analyse de la fonction rénale et des marqueurs moléculaires de lésion rénale (voir ci-dessus). Des biopsies systématiques du greffon seront pratiquées à J7, J14, J30 et J90 afin d'évaluer les lésions histologiques et d'effectuer des analyses moléculaires des marqueurs de lésion rénale, d'inflammation, de stress oxydant et de fibrose.

Publication :

Barrera-Chimal J, André-Grégoire G, Cat AN dinh, Lechner SM, Cau J, Prince S, et al. Benefit of Mineralocorticoid Receptor Antagonism in AKI: Role of Vascular Smooth Muscle Rac1. JASN. 4 janv 2017;28(4):1216-26.

Approche métabolomique pour l'évaluation de la qualité des greffons de rein conservés sur machine de perfusion avant transplantation (Chantal LE GUELLEC)

Introduction : L'évaluation de la qualité des greffons conservés sur machines de perfusion est cruciale car elle conditionne la reprise optimale de fonction du greffon, celle-ci étant associée au pronostic de la greffe, à moyen et à long terme. Cette évaluation repose actuellement sur des paramètres liés à la machine ou sur quelques biomarqueurs biochimiques isolés, dont l'utilisation n'est pas consensuelle. Les machines sont actuellement réservées aux reins issus de donneurs à critères élargis mais leurs indications pourraient s'étendre s'il s'avérait qu'elles procurent un avantage dans d'autres situations.

Objectifs : La métabolomique, ciblée ou non-ciblée, pourrait fournir des éléments d'appréciation importants sur l'état du greffon avant, et en période post-transplantation immédiate. Nos résultats récents indiquent que les urines prélevées à J7 après la greffe présentent un profil métabolomique particulier et que celui-ci diffère selon que la reprise de fonction du greffon soit bonne (IGF) ou pas (DGF/SGF). Nous faisons donc l'hypothèse que le profil métabolomique pourrait constituer un biomarqueur d'évaluation de la qualité du greffon, depuis le prélèvement jusqu'à la transplantation.

Méthodologie : Cette étude portera sur tous les couples donneur/receveur pris en charge dans notre centre sur 18 mois consécutifs. Tous les reins issus de donneurs décédés, qu'ils présentent des critères élargis ou pas, seront placés sur machine à perfusion. Nous utiliserons la spectroscopie RMN et de masse (UPLC/MSMS et GC/MS) pour analyser 3 types d'échantillons : urines du donneur, liquide de perfusion de la machine et premières urines du receveur, afin de caractériser les empreintes métaboliques correspondantes. Pour chacune de ces situations, nous rechercherons les facteurs liés au patient ou à l'environnement susceptibles de modifier les profils. Dans une seconde étape, nous chercherons les liens existant entre les profils métabolomiques et le devenir du greffon, caractérisé par la reprise de fonction du greffon puis par le débit de filtration glomérulaire à 3 mois. Les métabolites discriminants seront identifiés et nous tenterons de les rattacher aux voies physiopathologiques correspondantes.

Résultats attendus : La métabolomique devrait permettre de détecter des anomalies traduisant les dommages cellulaires associés aux processus pathologiques impliqués à ce stade de la greffe. Cette étude permettra aussi d'étudier si ces anomalies métabolomiques ont un impact sur le devenir rénal du greffon à court et moyen terme. Ceci permettrait donc de proposer un nouvel outil utilisable ensuite pour :

- évaluer la qualité des greffons avant transplantation,
- évaluer l'impact de mesures correctives (modifications des conditions de perfusion, ajout dans le perfusat d'agents protecteurs vis-à-vis d'un mécanisme faisant intervenir une voie physiopathologique particulière,...)
- optimiser, à terme, la qualité des greffons et fournir des éléments de sélection des greffons transplantables.

Etude des mécanismes du rejet chronique des allogreffes rénales associées avec les anticorps HLA de classe II (Nuala MOONEY)

Objectifs

Ce projet déterminera les mécanismes à la base de l'association entre hauts titres d'allo-anticorps anti-HLA de classe II et les altérations des cellules endothéliales au cours du rejet chronique de rein allogénique greffé. Les effets directs aussi bien qu'indirects de la liaison des allo-anticorps aux cellules endothéliales microvasculaires seront déterminés avec une attention particulière portée à la signalisation initiée par le HLA de classe II et les implications sur la réponse allogénique des lymphocytes T CD4+. Les effets de cette signalisation sur les fonctions des monocytes seront également déterminés, à savoir leur recrutement, leur adhésion et leur différenciation en cellules effectrices au contact de cellules endothéliales activées. Les résultats expérimentaux obtenus in vitro seront validés sur des biopsies de patients.

Résultats attendus

Les résultats de cette étude révéleront (i) les interactions moléculaires impliquées dans les altérations des cellules endothéliales induites par les allo-anticorps anti-HLA de classe II, révélant de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques potentielles (ii) comment la réponse allogénique des lymphocytes T CD4+ est modifiée par l'activation des cellules endothéliales induite via HLA-DR (iii) les phénotypes et fonctions des sous-populations de monocytes qui adhèrent aux cellules endothéliales sensibilisées par les anticorps anti-HLA-DR

Méthodes

Nous mettrons à profit les expertises techniques du laboratoire en protéomique et biologie moléculaire pour identifier les interactions moléculaires (analyses de signalisation par électrophorèse uni- et bidimensionnelle, immunoprécipitation, Western Blot, qRT-PCR), en caractérisation de populations cellulaires pour identifier différents types de T CD4+ et de monocytes (FACs multi-couleurs, trieur de cellules, expression de cytokines). Notre équipe a récemment développé une plateforme pour l'identification phénotypique et fonctionnelle de sous-populations de monocytes humains, qui sera utilisée pour déterminer les sous-populations se liant aux cellules endothéliales activées par l'engagement d'HLA-DR par des allo-anticorps. Nos résultats seront validés par l'utilisation d'antisérum de patients et de biopsies fournies par des membres de notre groupe de recherche également membres du Laboratoire Régional d'Histocompatibilité et du service de Néphrologie.

Publications :

1. Cross AR, Lion J, Loiseau P, Charron D, Taupin J-L, Glotz D, et al. Donor Specific Antibodies are not only directed against HLA-DR: Minding your Ps and Qs. *Human Immunology*. 1 nov 2016;77(11):1092-100.
2. Lion J, Taflin C, Cross AR, Robledo-Sarmiento M, Mariotto E, Savenay A, et al. HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion. *Am J Transplant*. 1 mai 2016;16(5):1408-20.

Optimisation et sécurisation de la greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir d'iPSCs humaines (François MOREAU-GAUDRY)

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont un outil prometteur pour la thérapie cellulaire et génique. Elles sont produites en dehors de l'organisme par reprogrammation puis elles sont amplifiées et différenciées en n'importe quel type de cellule, avant d'être greffées. Elles ne présentent pas les problèmes éthiques liés à l'utilisation de cellules souches d'embryons, ni de rejet de greffe puisqu'elles sont obtenues à partir du patient lui-même. **Deux limitations principales** empêchent leur utilisation thérapeutique en hématologie:

1. L'échec de la greffe des cellules souches hématopoïétique (CSH) dérivées d'iPSCs *in vivo*.

De nombreux laboratoires, dont le nôtre, ont réussi à dériver des iPSCs humaines en cellules hématopoïétiques *in vitro*. Cependant, aucune équipe n'a rapporté une reconstitution efficace *in vivo* d'une hématopoïèse dans des souris humanisées immunodéficientes à partir de ces cellules.

2. Le risque de formation de tératome à partir d'iPSCs résiduelles persistant dans le greffon.

Ce risque n'a jamais été évalué pour une application en hématologie après administration intraveineuse du greffon.

Pour optimiser la greffe de CSH issues d'iPSCs, notre projet est de **développer un protocole efficace et reproductible de différenciation hématopoïétique**. Pour cela nous testerons une série de nouvelles conditions expérimentales notamment le rôle du microenvironnement stromal. Afin de faciliter grandement l'analyse des résultats, nous proposons de développer et valider un **système de criblage** par l'utilisation d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un **promoteur CSH-spécifique**. Les meilleures conditions sélectionnées par le criblage seront choisies pour être testées *in vitro* par une analyse phénotypique complète en cytométrie en flux et une analyse quantitative comparative de l'expression de certains gènes spécifiques des CSHs par Q-RT-PCR. Le protocole le plus efficace par cette double sélection sera évalué *in vivo* par greffes dans des souris immunodéficientes.

Pour sécuriser la greffe de CSH issues d'iPSCs le prérequis est de définir les capacités tératogènes des iPSCs et de leurs dérivés incomplètement différenciés, lorsqu'elles sont délivrées par voie intraveineuse. Si le risque de tératome s'avère élevé, nous proposons de **prévenir leur formation** par une **purge préventive** des iPSCs résiduelles à l'aide **d'un gène suicide**, après différenciation, mais avant greffe. De plus, les cellules seront dotées d'un **autre gène suicide** activable en post-implantatoire pour une **élimination curative** de tumeurs éventuelles.

Ainsi, ce projet permettra pour la première fois (1) de réussir la greffe de CSH dérivées des iPSCs, (2) de quantifier le risque de formation de tumeurs à partir de cellules reprogrammées et de leurs dérivés pour des greffes hématologiques, (3) de développer des outils pour la prévention des tumeurs et leur élimination, et (4) d'appliquer ces progrès à une maladie héréditaire du globule rouge : la porphyrie érythropoïétique congénitale.

Publication :

Bedel A, Beliveau F, Lamrissi-Garcia I, Rousseau B, Moranvillier I, Rucheton B, et al. Preventing Pluripotent Cell Teratoma in Regenerative Medicine Applied to Hematology Disorders: Evaluation and Control of Teratoma Risk in Hematology. STEM CELLS Translational Medicine. févr 2017;6(2):382-93.

Evaluation du bénéfice de la transplantation pulmonaire sur la survie et facteurs associés à ce bénéfice (Raphaël PORCHER)

La transplantation pulmonaire est la seule option thérapeutique susceptible d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients souffrant d'insuffisance respiratoire chronique grave. En dépit d'améliorations constantes, la survie des patients après transplantation pulmonaire reste cependant limitée et plusieurs études ont remis en cause le bénéfice de la transplantation pulmonaire sur la survie des patients, bien que les méthodes statistiques employées soient discutables. L'étude du bénéfice de la transplantation pulmonaire et des facteurs associés à ce bénéfice reste donc d'actualité, y compris dans un contexte où des scores d'allocation des greffons ont été implémentés pour optimiser leur allocation. Les problématiques principales sont de déterminer quels patients inscrire sur les listes d'attente d'une transplantation pulmonaire, le moment idéal d'inscription, quels patients transplanter et le moment idéal de transplantation.

Les objectifs de ce projet de recherche sont de déterminer le bénéfice de la transplantation pulmonaire et les paramètres associés à ce bénéfice dans les trois principales indications de transplantation pulmonaire dans le monde qui sont la BPCO, la mucoviscidose et la fibrose pulmonaire. En l'absence d'essais cliniques randomisés, l'évaluation du bénéfice de la transplantation pulmonaire repose sur la modélisation statistique de données observationnelles. Nous utiliserons pour cela les données de l'International Society for Heart & Lung Transplantation (ISHLT). Les méthodes utilisées doivent cependant tenir compte de la nature observationnelle des données tout en produisant des résultats qui puissent avoir une interprétation causale, c'est-à-dire qui puissent permettre de conclure au bénéfice de la transplantation pulmonaire en soi, et pas de la transplantation pulmonaire associées à la décision de transplantation. Dans ce contexte, nous avons identifié six approches qui seront comparées : des modèles pour le risque de décès (modèles joints pour des processus longitudinaux et des données de survie, modèles marginaux structuraux, modèles structuraux emboîtés, stratification séquentielle) et deux types de modèles pour la moyenne de survie.

D'un point de vue clinique, ce projet permettra d'estimer le bénéfice de la transplantation pulmonaire dans les trois pathologies analysées (mucoviscidose, BPCO et fibrose pulmonaire), ainsi que les paramètres associés à ce bénéfice, à l'aide des méthodes les plus récentes adaptées à la nature des données. D'un point de vue méthodologique, il permettra de déterminer les avantages et les limites des approches envisagées pour estimer le bénéfice de la transplantation pulmonaire.

Publication :

Harhay MO, Porcher R, Cantu E, Crowther MJ, Christie JD, Thabut G, et al. An Alternative Approach for the Analysis of Time-to-event and Survival Outcomes in Pulmonary Medicine. *Am J Respir Crit Care Med.* 27 avr 2018;

Poursuite de l'Etude pilote de la transplantation de greffons pulmonaires réhabilités en ex vivo (Edouard SAGE)

Objectif : L'objectif principal est de poursuivre « l'étude pilote de la transplantation de greffons pulmonaires réhabilités en ex vivo » en incluant les 10 derniers patients. Cette étude a pour but de déterminer le nombre de greffons « à critères élargis » que la technique de réhabilitation ex vivo permet d'utiliser pour la transplantation et, de ce fait, le gain moyen réel par patient en terme de délai d'attente avant transplantation.

Les objectifs secondaires de jugement concernent :

- la réduction que l'on peut escompter du nombre de décès de patients en liste d'attente,
- la technique de réhabilitation selon la méthode mise au point à Toronto.
- le suivi des transplantations réalisées.

Méthodologie : Il s'agit d'une étude prospective, bicentrique et ouverte réalisée à l'hôpital Foch et au Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, qui commence à la signature du consentement, se termine à la 24ème heure post-opératoire.

a) information et consentement : information concernant le protocole délivrée lors de l'inscription sur la liste d'attente de transplantation.

b) prélèvement pulmonaire :appel de l'Agence de Biomédecine avec proposition d'un greffon « à critères élargis » non utilisé par les équipes de greffe, prélèvement de ce greffon par l'équipe de transplantation,

c) réhabilitation ex vivo selon la technique de Toronto: préparation du greffon, mise du greffon dans le dispositif médical XVIVO, initiation de la perfusion avec le liquide de Steen et ventilation ex vivo, phase d'équilibre de la perfusion et ventilation ex vivo, évaluation du greffon avec décision de transplantation du greffon réhabilité.

d) transplantation pulmonaire selon la technique usuelle, prise en charge anesthésique, chirurgicale, réanimatoire et pneumologique inchangée par rapport à une transplantation conventionnelle.

Résultats attendus : Augmentation du nombre de greffons transplantés et ainsi diminution du temps d'attente sur liste de transplantation.

Etude de l'immunité Natural Killer au cours des infections à CMV après transplantation pulmonaire (Delphine SAUCE)

Contexte : La transplantation pulmonaire est actuellement une option thérapeutique privilégiée dans certaines affections respiratoires chroniques au stade d'évolution terminale comme la mucoviscidose, l'emphysème et la fibrose pulmonaire. Le rejet est l'une des principales complications de la greffe pulmonaire et compromet à long terme la survie des patients.

L'implantation d'un nouvel organe (greffon) dans un organisme impose un traitement immunosuppresseur afin de prévenir son rejet. Mais ce traitement favorise la survenue d'infection potentiellement grave avec des microorganismes opportunistes tels que le cytomégalo virus (CMV). Le CMV appartient à la famille des herpes virus et infecte plus de la moitié de la population adulte. Chez le sujet immunocompétent, l'infection à court terme est le plus souvent bénigne et asymptomatique. Par contre, chez les immunodéprimés (tels que les transplantés) l'infection peut conduire à des manifestations cliniques sévères. Or, la greffe pulmonaire est la greffe d'organe solide la plus à risque d'infection/maladie CMV et plusieurs études suggèrent une association entre le rejet et l'infection à CMV et un rôle de l'infection à CMV dans la genèse du rejet.

Objectifs : Nous souhaitons nous intéresser à l'implication des mécanismes d'immunité antivirale vis à vis de CMV (mettant en jeu les cellules Natural Killer) dans le rejet aigu de greffe pulmonaire chez l'homme. En effet, les cellules NK, qui représentent 5% à 15% des lymphocytes périphériques, participent aux réponses immunitaires innées contre les cellules tumorales ou infectées par des virus. Contrairement aux cellules T, les cellules NK peuvent tuer leur cible très rapidement. Leur rôle au cours des infections a été récemment mis en exergue dans différents modèles (Hépatite B/ C, Chikungunya) où une prolifération forte de cellules NK était observée post-infection. L'hypothèse de notre travail est que les cellules NK jouent un rôle dans le contrôle de la réactivation à CMV chez les patients ayant subi une transplantation pulmonaire. L'objectif de ce projet sera d'étudier la réponse immunitaire anti-virale NK au cours d'une réactivation du CMV chez ces patients afin de mettre en évidence un rôle des cellules NK dans le contrôle de ces infections, rôle qui est souvent cité, mais qui n'a encore jamais été décrit *in vivo* chez des patients ayant subi une transplantation d'organe solide.

Methodologie : Les échantillons sanguins de 46 patients adultes transplantés à l'hôpital Foch ont été collectés et repartis en 3 groupes selon le risque attendu d'évènement CMV :

Groupe 1 (N=17): à fort risque d'évènements cliniques CMV incluant les patients [D+/R-].

Groupe 2 (N=18): à risque modéré d'évènements cliniques CMV incluant les patients [D-/R+] ou [D+/R+].

Groupe 3 (N=11): à faible risque d'évènements cliniques CMV avec les patients [D-/R-].

A partir de ces différents prélèvements, une étude *ex vivo* des cellules NK circulants sera menée aussi bien pour déterminer leur phénotype que leur fonction. Cette approche sera complétée par une étude *in vitro* des cellules NK vis-à-vis des cellules infectées par le CMV.

Résultats attendus : Une étude récente effectuée dans le cadre des greffes de cellules souches hématopoïétiques montre que les « cellules NK mémoires » induites par le CMV pourraient avoir un rôle dans le contrôle du rejet clinique et des infections chez ces patients après transplantation. Ceci reste à vérifier dans le contexte de transplantation d'organe solide tel que les poumons.

Publication :

Bayard C, Lepetitcorps H, Roux A, Larsen M, Fastenackels S, Salle V, et al. Coordinated expansion of both memory T cells and NK cells in response to CMV infection in humans. *Eur J Immunol.* 1 mai 2016;46(5):1168-79.

Réponse humorale alloimmune après greffe d'îlots de Langerhans : caractéristiques et impact sur la fonction du greffon (Olivier THAUNAT)

Introduction :

La greffe d'îlots de Langerhans est une technique prometteuse permettant de restaurer l'insulino-sécrétion des patients diabétiques de type I. En théorie elle pourrait offrir les mêmes bénéfices que la transplantation pancréatique : moins d'hypoglycémies iatrogènes, meilleure qualité de vie et prévention des complications microvasculaires invalidantes, tout en étant beaucoup moins invasive.

Hélas ses résultats à long terme sont encore décevants avec une survie du greffon à 5 ans estimée à seulement 10%.

En transplantation d'organes solides vascularisés, il est clairement démontré que la cause majeure de perte tardive des transplants sont les dégâts consécutifs à la fixation des anticorps anti-HLA aux cellules endothéliales allogéniques du greffon. L'importance de ces mécanismes lésionnels dans le rejet des greffes cellulaires (où la vascularisation provient du receveur) reste à établir.

Objectif primaire :

Déterminer si la présence d'anticorps anti-HLA anti-donneur est associée avec une moins bonne survie du greffon et définir quels paramètres de la réponse humorale alloimmune permettent de stratifier le risque

Objectifs secondaires :

- 1) Fournir une description précise de la réponse humorale anti-HLA anti-donneur après greffe d'îlots.
- 2) Identifier les facteurs de risques associés à l'apparition des anticorps anti-HLA anti-donneur après greffe d'îlots.

Méthodologie :

Etude rétrospective multicentrique s'appuyant sur le réseau GRAGIL. 109 patients ayant reçu au moins une greffe d'îlots sous un régime immunosuppresseurs de type Edmonton dans un des 7 centres participants ont été évalués pour i) la présence de matériel biologique permettant un typage complet du (ou des) donneur (s), ii) la présence d'un sérum pré greffe de référence, iii) la présence de sera 3 mois, 1 an post-greffe puis tous les ans.

48 patients répondant à ces critères ont été identifiés. Le recueil des données cliniques et biologiques a déjà commencé.

L'analyse de la réponse anticorps anti-HLA post greffe d'îlots (spécificité, titre, capacité à activer la voie classique du complément) sera réalisée en aveugle des données cliniques et biologiques selon la technique sensible du « flow bead assay » dans un laboratoire d'immunologie de référence. Un effort particulier a été réalisé pour assurer la comparabilité des échantillons.

Résultats attendus :

Une durée d'étude de 24 mois devrait être suffisante pour nous permettre de caractériser, avec une précision sans précédent dans la littérature, la réponse anticorps anti-HLA post greffe d'îlots.

Les analyses statistiques détermineront si il est possible d'établir une corrélation entre cette réponse et la survie des greffes d'îlots.

Publication :

Pouliquen E, Baltzinger P, Lemle A, Chen C-C, Parissiadis A, Borot S, et al. Anti-Donor HLA Antibody Response After Pancreatic Islet Grafting: Characteristics, Risk Factors, and Impact on Graft Function. Am J Transplant. 1 févr 2017;17(2):462-73.