

APPEL D'OFFRES 2010
« Recherche et greffe »
Résumés résultats et publications

Chercheur	Sujet de recherche	THEME
Nicolas PICHON	Intérêt du FibroScan® dans l'évaluation des greffons hépatiques chez les sujets en état de mort encéphalique avant prélèvement d'organes	2
Eliane PIAGGIO	Induction de tolérance In vivo via l'injection d'IL-2 : Potentiel thérapeutique dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte	3
Sophie EZINE	Molecular characterization of T cell engagement: towards an immunotherapy of transplantations	3
Olivier THAUNAT	Evaluation de l'activité catalytique des IgG circulantes comme test prédictif non-invasif de la néphropathie chronique d'allogreffe : étude prospective multicentrique CATAPULT	3
Emmanuel MARTINOD	Régénération trachéale par ingénierie tissulaire sur matrice artérielle allogénique cryoconservée	6
Olivier MALARD	Association cellules médullaires/souches-biomatériaux phosphocalciques pour la réparation osseuse à trophicité diminuée	6
Annick LEFEVRE	Evaluation de l'empreinte parentale dans la lignée ES de singe Rhésus LYON-ES1 et après différenciation en précurseurs neuronaux et cellules neuronales in vitro ou in vivo	6
Robert BAROUKI	Diagnostic biologique du rejet après transplantation cardiaque dans la cohorte multicentrique française CALCICOEUR	4
René FERRERA	Transplantation orthotopique expérimentale de cœurs prélevés arrêtés. Intérêt du post-conditionnement au moment de la reperfusion	2
Nathalie AUGE	Rôle de l'alloréaction humorale dans le développement de la vasculopathie de transplantation	3 & 4
François LE NAOUR	Développement d'une méthode d'évaluation de la qualité des greffons par spectroscopie infrarouge pour les transplantations hépatiques	2
Pascal DELEPINE	Développement d'un substitut méniscal cellularisé à partir d'une matrice inerte et de cellules souches mésenchymateuses	6
Jean-Paul SOULILLOU	Analyse phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B chez des patients tolérants un greffon rénal	3
Bernard DEVAUCHELLE	Protocolisation de la restitution du visage du donneur lors des prélèvements des ATC faciaux	1
Anne WOJTUSCISZYN	Stratégie de préservation de CREB afin d'améliorer la survie et la fonction des îlots pancréatiques humains isolés pour la greffe	2
Anne WEBER	Thérapie génique ex vivo de progéniteurs hépatiques reprogrammés à partir de fibroblastes humains déficients en récepteur aux LDL	6
Onnik AGBULUT	Thérapie cellulaire cardiaque : Utilisation de feuilles de cellules souches dans le traitement des cardiopathies non-ischémiques	6

THEMES DE RECHERCHE

- 1) Etudes en sciences humaines, économiques et sociales, ainsi qu'en santé publique portant notamment sur les réflexions éthiques que font surgir les enjeux nouveaux des activités de prélèvement et de greffe ;**
- 2) Amélioration des prélèvements, évaluation et amélioration de la sécurité et de la qualité des greffons, modalités de conservation ;**
- 3) Immunologie de la transplantation ;**
- 4) Pharmacologie et greffe ;**
- 5) Insuffisance terminale d'organes : études en épidémiologie, santé publique, besoin et offre de soins;**
- 6) Ingénierie cellulaire et tissulaire comme alternative à l'allogreffe.**

Intérêt du FibroScan® dans l'évaluation des greffons hépatiques chez les sujets en état de mort encéphalique avant prélèvement d'organes

Nicolas PICHON (CHU Dupuytren)

Justification : Seuls 2/3 des patients en état de mort encéphalique (EME) faisant l'objet d'un prélèvement d'organes ont un prélèvement de greffon hépatique. Parmi le 1/3 restant, certains présentent une contre-indication au prélèvement du foie, tandis que d'autres sont récusés sur des critères emprunts de subjectivité. Une part importante des refus de prélèvement hépatique est liée à un état stéatosique supposé de l'organe. La stéatose est évaluée au lit du donneur en fonction de ses antécédents, de la biologie hépatique, de l'imagerie et de l'aspect macroscopique en cours de prélèvement. Ces critères de sélection sont sources d'erreur et devant la pénurie de greffons et les listes d'attente qui ne cessent de croître, il semble intéressant d'introduire de nouveaux critères objectifs de sélection et d'acceptation des greffons hépatiques. Une récente étude pilote réalisée par notre équipe au CHU de Limoges a montré des résultats encourageants concernant l'élasticité du foie mesurée par élastographie impulsionnelle (FibroScan®). Cet outil diagnostique, simple, rapide et objectif, permettrait de réduire le nombre de foies récusés à tort et le nombre de déplacements inutiles d'équipes de greffe hépatique repartant du site de prélèvement sans organe.

- **Objectif principal** : L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'intérêt de la valeur d'élasticité hépatique (EH) mesurée par Fibroscan® dans la sélection des greffons hépatiques chez les donneurs en EME.

- **Objectifs secondaires** :

1/ Evaluer l'intérêt de la valeur du paramètre d'atténuation contrôlé (CAP), correspondant à un index ultrasonore de stéatose du Fibroscan®, dans la sélection des greffons hépatiques chez les donneurs en EME ;

2/ Déterminer la valeur diagnostique de l'EH combinée au CAP dans le diagnostic de stéatose hépatique incompatible avec la greffe chez les donneurs en EME ;

3/ Définir la valeur pronostique de l'EH et du CAP pour la survie du greffon hépatique une semaine et un mois après la transplantation.

- **Stratégie d'analyse** :

Essai prospectif, multicentrique, d'évaluation d'une méthode diagnostique, sur échantillon représentatif.

Analyse principale :

1/ Etablir les qualités métrologiques de la mesure de l'EH par FibroScan®, lors de la sélection des greffons hépatiques, pour évaluer les degrés de fibrose et de stéatose à l'aide des indices suivants : sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive, valeur prédictive négative, pour un seuil optimal d'EH déterminé à l'aide d'une courbe ROC. La méthode de référence retenue sera la biopsie hépatique. 2/ Etudier la relation entre la valeur d'EH donnée par le FibroScan® et les taux de fibrose et de stéatose observés sur la biopsie hépatique par régression linéaire multiple. 3/ Etudier, à l'aide du test non paramétrique Kappa, la concordance entre la décision qui serait prise à l'issue de la réalisation du FibroScan® sur la base du seuil optimal d'EH et la conclusion de la biopsie hépatique d'une part, la conclusion de l'équipe de greffe selon les critères habituels de sélection des greffons d'autre part.

Analyses secondaires : 1/ *Paramètre d'atténuation contrôlé (CAP)* : Même plan d'étude qu'en analyse principale sera appliqué au CAP. 2/ *Pertinence de l'utilisation combinée des valeurs d'EH et du CAP* : A- Mettre en place un modèle prédictif du caractère prélevable ou non du foie en fonction des valeurs d'EH et du CAP données par le FibroScan® et des paramètres habituels de sélection du greffon par régression logistique. B- Mettre en place un modèle prédictif de l'état stéatosique du foie en fonction des valeurs d'EH et du CAP

données par le FibroScan® et des paramètres habituels de sélection du greffon par un modèle linéaire. 3/ *Caractère prédictif de la survie du greffon* : Rechercher la valeur pronostique, en termes de caractère fonctionnel du greffon à J8 et J28 après la transplantation, des valeurs d'EH et du CAP données par le FibroScan® par régression logistique.

- **Critères d'inclusion** : Patient de plus de 18 ans en EME avéré, confirmé par les examens cliniques légaux utilisés dans chaque centre, chez lequel il est envisagé un prélèvement d'organes et en état clinique suffisamment stable pour mener la procédure de prélèvement à terme.

- **Critères de non inclusion** : 1/ Opposition du défunt au prélèvement d'organes et à la réalisation d'une recherche clinique sur sa personne de son vivant (inscription au Registre National des Refus) ; 2/ Opposition de la famille au prélèvement d'organes sur le défunt ; 3/ Restriction émise par la famille quant au prélèvement hépatique ; 4/ Grossesse en cours lors du passage en EME.

- **Procédures de la recherche** : Après vérification des critères d'éligibilité, un FibroScan® sera réalisé avant départ au bloc opératoire pour prélèvement. L'équipe de greffe et l'Agence de la biomédecine resteront en aveugle du résultat du FibroScan® et l'opérateur réalisant le FibroScan® restera en aveugle des examens habituellement pratiqués en vue du prélèvement d'organes. Une biopsie du foie sera réalisée au bloc opératoire lors du prélèvement ou en percutané dans le service de réanimation si le greffon hépatique est jugé non prélevable par l'ABM sur les critères habituels de sélection du greffon. En cas de prélèvement et de greffe hépatique, la fonction du greffon sera suivie pendant 28 jours après la greffe. L'analyse des biopsies hépatiques sera effectuée par deux anatomopathologistes expérimentés en aveugle l'un de l'autre, en aveugle des critères de sélection habituels et en aveugle du devenir du greffon hépatique.

Taille d'étude : Dans notre étude pilote, nous avons observé une proportion $p_N=81,25\%$ de foies prélevables et une proportion $p_A=18,75\%$ de foies non prélevables. Dans notre étude prospective, l'aire sous la courbe ROC attendue est de 80%. Nous souhaitons observer une amplitude pour son intervalle de confiance de moins de 10%. Selon la méthode de Hanley et McNeil, le nombre de sujets nécessaire est de 635.

- **Faisabilité** : En 2008, les 24 centres acceptant de participer à l'étude ont pratiqué 634 prélèvements multi-organes et prélevé 434 greffons hépatiques, ce qui, lissé sur la durée de l'étude, représente une cohorte potentielle de 1585 donneurs éligibles et 1085 greffons hépatiques.

- **Retombées attendues** : Le FibroScan® est un outil simple, rapide et non invasif permettant le diagnostic et l'évaluation de la fibrose par mesure de l'élasticité hépatique. Un nouveau paramètre (CAP) mesuré en même temps que l'élasticité, a récemment été développé pour l'évaluation de la stéatose hépatique. La détermination d'une valeur seuil d'un index basé sur l'EH et/ou le CAP permettant de discriminer les foies éligibles à la greffe devrait permettre de réduire de 20% les déplacements inutiles des équipes de transplantation repartant sans greffon et d'augmenter de 10% le nombre de greffons hépatiques prélevés et greffés, ceci dans un contexte d'allongement des listes d'attente de transplantation hépatique.

Publication :

Mancia C, Loustaud-Ratti V, Carrier P, Naudet F, Bellissant E, Labrousse F, et al. Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurements for Steatosis Assessment in the Liver Transplant of Brain Dead Donors: Transplantation. févr 2015;1.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Intérêt du Paramètre d'Atténuation Contrôlé (CAPTM) obtenu à partir du FibroScan® dans la mesure non invasive du degré de stéatose des donneurs en état de mort encéphalique avant prélèvement d'organes

Claire Mancía,¹ Véronique Loustaud-Ratti,^{2,3,4} Paul Carrier,² Florian Naudet,⁵ Eric Bellissant,^{5,6} François Labrousse,^{3,7} and Nicolas Pichon^{8,9}

¹ Service d'Anesthésie, CHU de Limoges; ² Service d'Hépatologie, CHU de Limoges; ³ Faculté de Médecine, Limoges; ⁴ INSERM UMR 1092, Limoges; ⁵ Centre d'Investigations Cliniques INSERM 0203, CHU de Rennes; ⁶ Service de Pharmacologie Clinique, CHU de Rennes; ⁷ Service d'Anatomopathologie CHU de Limoges; ⁸ Service de réanimation, CHU de Limoges; ⁹ Coopération Hospitalière des Prélèvements d'Organes et de Tissus, CHU de Limoges.

Objectifs

En France, entre 25 et 35% des greffons hépatiques ne sont pas prélevés sur les donneurs en état de mort encéphalique.

Les critères de refus sont variés (biologie hépatique, Anamnèse, échographie abdominale, examen extemporané) et parfois subjectifs (aspect macroscopique...).

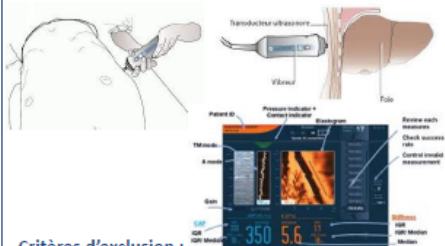
Le but de ce projet est de trouver un examen simple, reproductible, non-invasif, fiable et surtout objectif, comme critère de sélection dans les cas délicats (âge élevé, ATCDs,...)

Méthodologie

Dureté du foie:

Nous avons utilisé le FibroScan® (élastométrie impulsionnelle) afin de réaliser des mesures quantitatives non invasives de:

- La stéatose (paramètre d'atténuation contrôlée, CAPTM)
- La fibrose (paramètre d'élasticité, LS)



Critères d'exclusion :

- CI médicale au prélèvement hépatique
- Inscription au Registre National des Refus
- Refus de prélèvement de la famille

Effectif sur une période de 10 mois :

- 23 donneurs (11 hommes / 12 femmes)
- Age : 54±15 ans IMC : 27±7 Kg/m²
- Fatty Liver Index : 63±36
- Hepatic steatosis Index : 38±9
- 10 non prélevés (6 refus ABM / 4 décisions greffeurs)

Résultats

Les données du FibroScan® entre foies prélevés et foies non prélevés (ABM/Chirurgiens) étaient respectivement les suivantes :

- CAPTM : 229±41 dB.m-1 vs 284±60 dB.m-1 / 260±52 dB.m-1 (p<0.06)
- Elasticité : 11,5±6,4 KPa vs 22±23,1 KPa / 11,8±8,1 KPa (p=0.7)

	Foies non prélevés (10)		Foies prélevés et greffés (13)	P value
	ABM (6)	Surgeon(4)		
Age (years), mean ± SD	60 ± 10	49 ± 15	52 ± 17	0.9
BMI (Kg/m ²), mean ± SD	30 ± 8	27 ± 6	26 ± 8	0.4
Sex ratio M/F	5/1	2/2	4/9	0.1
HSL, mean ± SD	38 ± 11	37 ± 3	39 ± 10	0.8
FLI, mean ± SD	81.4 ± 24.2	47.9 ± 37.1	58.3 ± 39.1	0.5
TG (mg/dL), mean ± SD	95 ± 61	81 ± 23	105 ± 30	0.2
HDL Cholesterol (g/L), mean ± SD	1.03 ± 0.45	0.81 ± 0.27	0.93 ± 0.41	0.9
LS (KPa), mean ± SD	22 ± 23.1	11.8 ± 8.1	11.5 ± 6.4	0.7
CAP (dB.m ⁻¹), mean ± SD	284 ± 60	260 ± 52	229 ± 41	0.06

Comparaison FibroScan et histologie

	LS (KPa), mean ± SD	22 ± 23.1	11.8 ± 8.1	11.5 ± 6.4	0.7
	CAP (dB.m ⁻¹), mean ± SD	284 ± 60	260 ± 52	229 ± 41	0.06
Stéatose	Echography (n=18)	3/4	2/4	2/10	
	Tomodensitometry (n=5)	1/2	0	0/3	
Liver biopsy	Macrovesicular Steatosis, N (% of steatosis, mean)	3/6 (40%)	3/4 (40%)	6/13 (7.5%)	
	Microrovesicular Steatosis, N (% of steatosis, mean)	2/6 (10%)	1/4 (20%)	1/13 (10%)	
	Mixed Steatosis, N (% of steatosis, mean)	3/6 (33%)	0	2/13 (3%)	
Stéatose score	Fibrosis/Cirrhosis (S1 associated steatosis score)	1/6	1/4 (S2 associated steatosis score)	0/13	
	S0	1/6	2/4	11/13	
	S1	2/6	0	2/13	
	S2	2/6	2/4	0	
	S3	1/6	0	0	

- 4 greffons avaient, à posteriori, une analyse anatomopathologique normale et surtout des valeurs respectives de CAPTM et d'élastométrie normales
- 6 greffons non prélevés l'ont été à juste titre puisque ayant, à posteriori, une analyse anatomopathologique anormale et surtout des valeurs respectives de CAPTM et d'élasticité anormales lors de

Conclusions

Le FibroScan® répond aux critères recherchés.

La correspondance entre les valeurs combinées d'élasticité et de CAPTM obtenues à partir du FibroScan® et les critères habituels de sélection des greffons semble satisfaisante. Le FibroScan® pourrait constituer un paramètre d'évaluation objectif des greffons hépatiques chez les sujets en EME avant de valider le prélèvement hépatique. Des études complémentaires : PHRC-N FibroscaME

*Journées de l'Agence
28-29 mai 2015*

Induction de tolérance In vivo via l'injection d'IL-2 : Potentiel thérapeutique dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte

Eliane PIAGGIO (hôpital la Pitié Salpêtrière – CERVI)

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

En 1995, le groupe de Shimon Sakaguchi au Japon a identifié les LyT CD4+CD25+ immunosuppresseurs (Treg) dans le champ de l'autoimmunité. Nos travaux pionniers ont permis de montrer que l'élimination des Treg naturellement présents dans le greffon médullaire aggrave fortement la GVH, alors qu'au contraire, lorsque le greffon contient un grand nombre de Treg la GVH est contrôlée. La caractérisation et la purification des Treg chez l'homme restent aujourd'hui encore très complexes du fait notamment de l'absence d'un marqueur exclusif des Treg. Le corollaire est que l'utilisation clinique d'une population de Treg n'est pas à ce jour possible dans des conditions de bonnes pratiques de thérapie cellulaire. Ce projet propose une alternative à une purification et une expansion ex vivo des Treg. Il consiste à s'appuyer sur les propriétés immunosuppressives nouvellement identifiées de l'IL-2, notamment sa capacité à induire l'expansion des Treg in vivo.

Ce projet repose sur deux objectifs principaux.

1. Définir les modalités d'administration de l'interleukine 2 chez la souris permettant le contrôle de la maladie du greffon contre l'hôte.
2. Evaluer l'effet de l'IL-2 sur la reconstitution immunitaire post-greffe et l'effet anti-leucémique.

L'originalité de ce projet repose sur l'utilisation initialement contre intuitive de l'IL-2 comme agent immunosuppresseur que nous avons validée dans différentes situations physiopathologiques ainsi que sur le développement d'une modèle de xéno-GVH utilisant des LyT humains. Le transfert chez l'homme devrait de ce fait être plus rapide et plus simple. A terme, nous envisageons le développement d'un essai clinique dans des greffes à haut risques de GVH (partiellement compatibles à partir de donneurs sur fichier).

Publication :

Pérol L, Martin GH, Maury S, Cohen JL, Piaggio E. Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunology Letters*. déc 2014;162(2):173-84.

Molecular characterization of T cell engagement: towards an immunotherapy of transplantations

Sophie EZINE (INSERM- ADR Paris V)

Notre projet propose de développer des stratégies pour accélérer la reconstitution immune et augmenter la génération de cellules T naïves après greffe de moelle osseuse. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue une thérapie de choix dans les cas de lymphopénie (aplasie médullaire, déficits immunitaires et leucémies). Cependant la reconstitution du système lymphoïde est très lente et les infections sévères et fatales fréquentes. La grande hétérogénéité des CSH greffées est en partie responsable de ces résultats. Une stratégie possible serait d'isoler des CSH "spécialisées vers la lignée T" pour restaurer un système immunitaire compétent rapidement.

Objectifs principaux : L'approche que nous avons choisie est d'accélérer la différenciation des **CSH vers la voie lymphoïde T : définir les facteurs impliqués dans l'engagement vers la lignée T et caractériser les événements précoces de la colonisation thymique.**

L'engagement vers une lignée nécessite la stabilisation d'un programme de différenciation. L'identification de ces stades et l'engagement des cellules précurseurs nécessite le développement de méthodologies d'analyse au niveau d'une seule cellule. Au cours d'une étude antérieure réalisée à l'échelle unicellulaire, nous avons défini les facteurs présents dans les CSH et absents dans la lignée des progéniteurs lymphoïdes. Dans ce programme, nous proposons : 1) D'élargir cette étude à d'autres gènes en utilisant la même méthode (RT-PCR sur cellule unique). Ces gènes représenteront des facteurs pour lesquels nous ne disposons pas d'anticorps ; 2) de définir les conditions, *in vitro*, qui induisent les CSH à activer l'expression des gènes spécifiques aux progéniteurs lymphoïdes; 3) L'accélération du compartiment des cellules T naïves passe par une colonisation thymique. Cette étape semblerait être très réduite, voire nulle, après greffes de CSH. C'est dans ce but que l'identification de ces récepteurs de migration est d'importance.

Résultats attendus : L'ensemble de ce programme vise à définir comment les gènes impliqués dans la lignée T vont s'installer et être régulés au cours du développement des CSH. Cette stratégie va permettre d'identifier les acteurs impliqués pour manipuler la différenciation de la voie lymphoïde T. Dans tous les cas cette étude permettra de définir la cascade moléculaire entre les CSH et les progéniteurs lymphoïdes.

Méthodologie : Ce projet est basé sur l'analyse moléculaire de populations rares et faiblement représentées dans le système hématopoïétique. L'étude sur cellule unique par RT-PCR représente la meilleure stratégie pour répondre à des questions majeures et encore non résolues. La justification de l'*établissement d'un multiplex pour une étude sur cellule unique* : au cours du processus de différenciation, certains gènes sont activés et d'autres éteints ; en plus des différences qualitatives, il existe aussi des différences quantitatives dans l'expression de certains gènes, plutôt qu'une extinction (ou expression) complète. De plus, plusieurs gènes sont impliqués dans ces événements. Cette étape nécessite plusieurs phases : le design des primers, des tests d'efficacité des PCR et de compétition. L'ensemble de ce programme précède les travaux précliniques.

La stratégie que nous utilisons peut être appliquée à tous les cas où les populations d'intérêt sont rares et les études fonctionnelles *in vivo* difficiles. Elle pourra aussi servir de diagnostic dans certaines pathologies.

Publication :

Boudil A, Skhiri L, Candias S, Pasqualetto V, Legrand A, Bedora-Faure M, et al. Single-Cell Analysis of Thymocyte Differentiation: Identification of Transcription Factor Interactions and a Major Stochastic Component in $\hat{I}\hat{I}^2$ -Lineage Commitment. Liu G, éditeur. PLoS ONE. 1 oct 2013;8(10):e73098.

Evaluation de l'activité catalytique des IgG circulantes comme test prédictif non-invasif de la néphropathie chronique d'allogreffe : étude prospective multicentrique
CATAPULT

Olivier THAUNAT (Hôpital Edouard Herriot, Lyon)

La néphropathie chronique d'allogreffe (NCA), qui constitue la cause principale de perte de greffon au-delà de la première année de transplantation, est devenue une préoccupation majeure dans le contexte actuel de pénurie d'organe. Des études récentes ont montré que seule l'initiation précoce des traitements préventifs permettait d'en retarder le développement. Ce dernier point souligne l'importance de disposer d'outils diagnostics prédictifs, capables d'identifier les patients « à risque » de développer une NCA avant l'apparition des lésions histologiques irréversibles.

La physiopathologie de la NCA est un processus complexe dans lequel la cascade de la coagulation joue un rôle amplificateur. Des travaux fondamentaux ont identifié des « superanticorps » capables d'hydrolyser certains facteurs de la coagulation : les « Catalytic Antibodies » (CatAb). Notre groupe a émis l'hypothèse que les CatAb, présents dans la circulation des transplantés rénaux, pourraient ralentir le développement de la NCA chez ces patients en fournissant un meilleur contrôle de la cascade de la coagulation. Nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe INSERM U872 (Dr Lacroix-Desmazes), et montré, dans une étude pilote rétrospective, qu'un test *in vitro* quantifiant l'activité catalytique des IgG circulantes, permettait par une simple prise de sang de prédire la survenue d'une NCA 18 mois avant l'apparition des lésions histologiques.

Nous souhaitons maintenant mettre en place "CATAPULT", une étude prospective multicentrique pour :

- Valider l'activité catalytique des IgG comme marqueur prédictif précoce de la NCA
- Évaluer la sensibilité, la spécificité et la valeur seuil optimale de ce test
- Définir son intérêt dans la stratégie de diagnostic de la NCA

La durée de l'étude CATAPULT est estimée à 4 ans. Le nombre d'inclusion a été fixé à 100 patients répartis en 3 groupes en fonction du risque « à priori » de NCA (haut risque immunologique, haut risque non-immunologique et faible risque). L'activité catalytique des IgG circulantes sera mesurée le jour de la greffe (J0), à 3 mois, 6 mois, 9 mois, 1 an, 18 mois et 2 ans. Le diagnostic de NCA sera porté sur la progression des lésions histologiques sur les biopsies rénales (réalisées à J0, 3 mois et 2 ans). Au terme de l'étude, l'intérêt des CatAb comme test prédictif de la NCA sera évalué. La valeur seuil optimale du test sera établie pour chaque groupe à risque. Son intérêt dans la stratégie diagnostic de la NCA sera défini par comparaison avec les autres marqueurs non-invasifs disponibles : la protéinurie et le débit de filtration glomérulaire.

Si CATAPULT confirme les résultats de notre étude pilote, elle nous permettra de proposer les CatAb comme test prédictif efficace, peu coûteux et non-invasif pour stratifier le risque de NCA et permettre d'optimiser la thérapeutique (avant l'apparition des lésions histologiques irréversibles) afin de prolonger la survie des greffons. Des études complémentaires pourront alors être mises en place pour étudier l'intérêt des CatAb dans les autres types de transplantations et explorer leur potentiel thérapeutique.

Publication :

Mahendra A, Peyron I, Thauvat O, Dollinger C, Gilardin L, Sharma M, et al. Generation of Catalytic Antibodies Is an Intrinsic Property of an Individual's Immune System: A Study on a Large Cohort of Renal Transplant Patients. *The Journal of Immunology*. 15 mai 2016;196(10):4075-81.

Régénération trachéale par ingénierie tissulaire sur matrice artérielle allogénique cryoconservée

Emmanuel MARTINOD (Labo recherches biochirurgicales, Unité « transformations tissulaires induites », HEGP)

Introduction - Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières décennies dans le domaine de la transplantation d'organes ou de tissus, le remplacement trachéal n'a pas bénéficié d'une solution satisfaisante et continue de poser un véritable défi. L'auteur de ce projet s'est intéressé aux travaux menés depuis 1997 au sein de l'équipe du Laboratoire d'Etude des Greffes et Prothèses Cardiaques de l'Hôpital Broussais, UPRES 264, Université Paris V, concernant le remplacement trachéal par une allogreffe aortique. Dans la lignée des travaux réalisés au sein du laboratoire depuis maintenant 12 ans, nous proposons un projet de recherche ayant pour fondement l'utilisation d'allogreffe artérielle cryopréservée comme matrice pour la réalisation d'un substitut trachéal issu de l'ingénierie tissulaire chez le mouton.

Matériel et méthodes - Le modèle animal choisi pour cette étude est la brebis. Le groupe expérimental comportera 10 brebis chez lesquelles nous effectuerons une résection trachéale puis un remplacement par allogreffe artérielle cryopréservée transformée par ingénierie tissulaire et stabilisée par une endoprothèse. Le groupe contrôle comportera 10 brebis chez lesquelles nous effectuerons une résection trachéale puis un remplacement par allogreffe artérielle cryopréservée stabilisée par une endoprothèse. La première partie du travail sera le prélèvement puis la culture de cellules épithéliales respiratoires et de chondrocytes dérivés de cellules souches mésenchymateuses autologues. La seconde partie sera l'ensemencement des cellules sur une matrice aortique allogénique cryoconservée au sein d'un réacteur biologique et la génération du substitut trachéal. Enfin, la dernière partie sera l'implantation du greffon chez les brebis qui bénéficieront d'un suivi clinique et fibroscopique régulier. Leur sacrifice aura lieu à 1, 3, 6, 12 et 24 mois pour analyse histologique approfondie.

Résultats attendus - L'étude proposée permettrait une régénération trachéale ex-vivo à partir d'une matrice aortique allogénique cryopréservée. Les résultats attendus sont, outre ceux obtenus par transplantation d'allogreffe artérielle cryopréservée : la colonisation de la matrice par les cellules souches, la ré-épithélialisation du greffon par un épithélium cilié de type respiratoire et continu ainsi que la formation d'anneaux cartilagineux dans des délais inférieurs à ceux observés jusqu'alors, assurant ainsi une restauration fonctionnelle trachéale autorisant notamment le retrait précoce de l'endoprothèse.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Human Transplantation of a Biologic Airway Substitute in Conservative Lung Cancer Surgery

Martinod E, Radu D, Chouahnia K, Seguin A, Fialaire-Legendre A, Brillet PY, Destable MD, Sebbane G, Beloucif S, Valeyre D, Baillard C and Carpentier A

Departments of Thoracic and Vascular Surgery, Oncology, Pneumology, Anesthesiology and Intensive Care, Geriatric Medicine, and Radiology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CHU Avicenne, Pôle Hémato-Onco-Thorax, Université Paris 13, Faculté de Médecine SMBH, Bobigny, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CHU Henri Mondor, EFS Ile de France, Tissue Bank, Créteil, France; Université Paris Descartes, Fondation Alain Carpentier, EA Laboratoire de Recherches Biochirurgicales, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Objectives

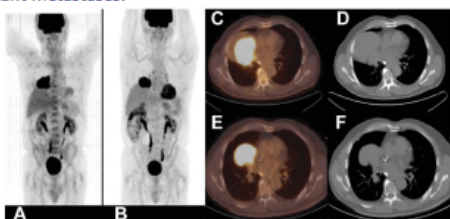
Surgical resection is currently considered to be the best treatment for early-stage non-small cell lung cancer. Central lung tumors often require a pneumonectomy in order to achieve a radical resection. Postoperative mortality rate of pneumonectomies could be as high as 26%. Facing this challenge, bronchial and pulmonary arterial sleeve-lobectomies were proposed in order to preserve the lung parenchyma, but it is used only rarely in the clinical practice.

After bronchial resection, the availability of an airway substitute would be critical to allow for a more anatomic reconstruction. In a sheep model we have shown that aortic autografts, and fresh or cryopreserved allografts could be valuable tracheal or bronchial substitutes with in-situ regeneration of epithelium from the native airways and of cartilage.

In this study we aimed at evaluating this strategy in the clinical setting in a high-risk patient with three predictive factors for increased post-operative mortality.

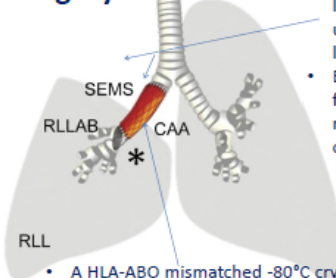
Methods

- A 78-year-old male patient with a past medical history of smoking (50 pack-years), hypercholesterolemia, prostatic adenoma, and resected benign colon polyps diagnosed with a right proximal non-small cell lung cancer.
- CT and PET scans, and fiberoptic bronchoscopy with biopsies showed a large squamous cell carcinoma of the middle lobe extending to the right upper lobe and the left atrium with no distant metastases.



- 3 cycles of neoadjuvant chemotherapy reduced the tumor size by 30%
- The patient gave written consent for a bronchial sleeve-upper bilobectomy and if necessary to the use of a cryopreserved aortic allograft from a certified tissue bank for airway reconstruction.

Surgery



- Complete resection of the lung cancer (intraparicardial upper bilobectomy with lymph node removal).
- Bronchial resection from the first centimeter of the right main bronchus to the origin of the lower lobe
- A HLA-ABO mismatched -80°C cryopreserved aortic graft was removed from dry ice and thawed (10 min at room temp. + 10 min at 37°C)
- At the end of the operation, the sparing right lower lobe reexpanded normally. No immunotherapy was given.

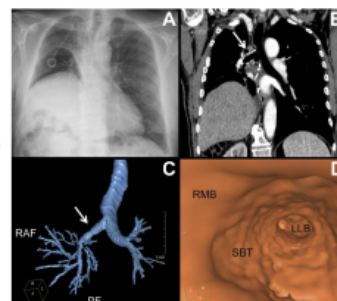
Results

Post-operatively, there was:

- a supraventricular arrhythmia leading to mild pulmonary edema
- A right lower lobe atelectasis
- A urinary retention due to prostatic adenoma

Patient was discharged at day 16.

Chest X-ray, CT and fiberoptic or virtual three-dimensional bronchoscopy up to 1 year found a well functioning reimplanted right lobe



Conclusions

This stage 1 surgical innovation demonstrated the feasibility and the patency of using cryopreserved aortic graft as a biological airway substitute. If confirmed in larger series of selected patients, this approach to airway transplantation could bring new perspectives in conservative lung cancer surgery

Association cellules médullaires/souches-biomatériaux phosphocalciques pour la réparation osseuse à trophicité diminuée

Olivier MALARD (Service ORL et de chirurgie cervico-faciale du CHU de Nantes, UMR 791 Inserm/Université de Nantes)

Le projet s'inscrit dans la continuité de travaux de recherche concernant l'ingénierie tissulaire osseuse menés depuis plusieurs années en collaboration entre l'Inserm U791 (LIOAD) et les services d'O.R.L. de chirurgie cervico et maxillo-faciale du CHU de Nantes. Contexte et objectifs. La thématique de la reconstruction osseuse en territoire hypotrophique a été développée sur le plan fondamental, préclinique et sous la forme d'études. Le bénéfice direct concerne des patients porteurs de préjudices esthétiques, morphologiques et fonctionnels liés à une perte de substance osseuse cervico-faciale. Les travaux de recherche fondamentale cherchent (visent) à préciser les interactions cellulaires et tissulaires au sein de l'os fragilisé (séquelles de radiothérapie, contexte déficitaire constitutionnel ou malformatif), et les associations cellules médullaires/mésenchymateuses - matériaux de reconstruction. Contrairement aux substitutions osseuses effectuées à l'aide de biomatériaux phosphocalciques en territoire sain, il a été établi au cours de travaux de recherche préalables que le caractère ostéoconducteur des céramiques phosphocalciques n'était pas suffisant pour garantir la cicatrisation de pertes de substance situées en territoire hypotrophique. Une association à des cellules capables de conférer un caractère ostéoinducteur a été démontré comme indispensable. L'**objectif** des travaux envisagés dans ce projet est :

- de préciser les conditions d'association des cellules au biomatériau, la part des cellules souches mésenchymateuses par rapport à la moelle osseuse totale, les conditions de culture cellulaire,
- de définir les interactions précoces conditionnant in vivo la néoformation osseuse. En particulier, le projet prévoit de caractériser la répartition cellulaire hôte au sein de la perte de substance osseuse substituée par l'association cellules / biomatériaux,
- d'isoler au sein des processus de réparation osseuse précoce après substitution, les mécanismes de néo angiogénèse, et la part prise par les cellules souches et/ou médullaires dans les événements précoces de colonisation vasculaire de la perte de substance.

Méthodologie. La méthodologie s'appuie sur les compétences et l'expérience acquise par le laboratoire en particulier :

- les modèles animaux de perte de substance survenant en territoire osseux à trophicité diminuée (modèle de séquelle d'irradiation thérapeutique chez le rat)
- les modèles d'allogreffes interindividuelles (modèle rat consanguin Lewis IA)
- la caractérisation qualitative et semi quantitative de la néoformation osseuse par analyse microscanner et l'utilisation d'allogreffes et de cellules médullaires GFP in vivo associées au biomatériau (modèle de rats immunodéprimés permettant la traçabilité des cellules allogreffées et leur implication dans la néoangiogénèse et néoostéogénèse).
- les matériaux de substitution osseuse, en particulier les céramiques phosphocalciques synthétiques, utilisées pour leur propriétés ostéoconductrices et biomimétiques osseuses. Les résultats serviront à optimiser les techniques d'ingénierie tissulaire pour l'expérimentation clinique, en alternative à la greffe osseuse, technique de référence source d'une lourde morbidité.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

APPORT DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (CSM) A L'ASSOCIATION PHOSPHATE DE CALCIUM BIPHASE-MOELLE OSSEUSE TOTALE (BCP-MOT) POUR LA NEOFORMATION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIE

P. Bléry 1,4,5, F. Espitalier 1,2, P. Corre 1,3, P. Weiss 1, J. Guicheux 1, B. Giumelli 4,5, Y. Amouriq 1,4,5, O. Malard 1,2

1. INSERM, UMRS 751, 13043, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
2. Service d'ORL et de Chirurgie Cervico-Faciale, 3 place Alexis Ricordeau, CHU Hôtel Dieu, 44042 Nantes Cedex 1, France
3. Service de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale, 1 place Alexis Ricordeau, CHU Hôtel Dieu, 44042 Nantes Cedex 1, France
4. Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France
5. Service d'Odontologie Restauratrice et Chirurgicale, 1 place Alexis Ricordeau, CHU Hôtel Dieu, 44042 Nantes Cedex 1, France

La réhabilitation prothétique des pertes de substance osseuse en territoire irradié : difficultés accrues

- effets secondaires des thérapeutiques anti-cancéreuses des VADS préjudiciables
- traitements de reconstruction limités (greffes osseuses, lambeaux, prothèses)

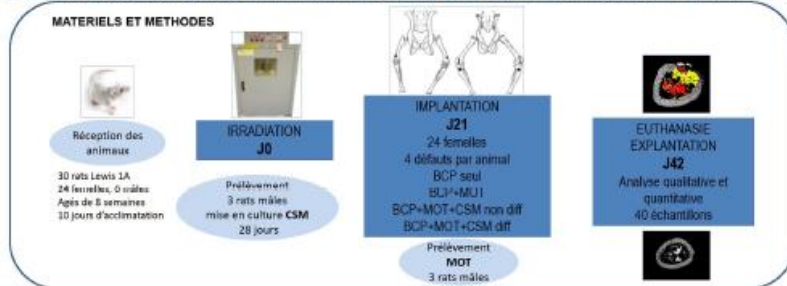
Les prothèses maxillo-faciales sont plus fonctionnelles avec un volume osseux plus important → développement de L'INGÉNIERIE TISSULAIRE :

Médecine régénérative : CSM → avenir?

Territoire irradié : BCP + MOT = meilleure réponse expérimentale actuelle pour la reconstruction osseuse [BCP = 60% HA - 40% βTCP]

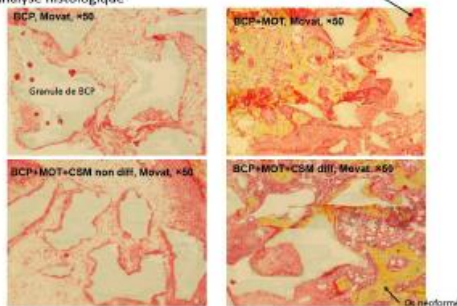


L'AJOUT DE CSM À L'ASSOCIATION BCP-MOT AMÉLIORE-T-IL LA NÉOFORMATION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIÉ?

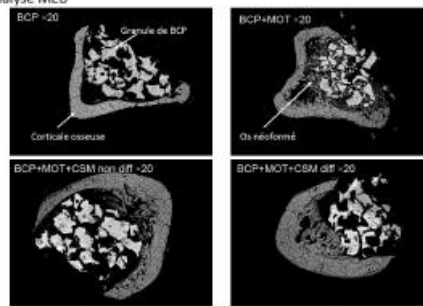


RESULTATS

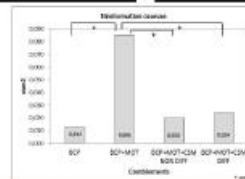
Analyse histologique



Analyse MEB



LA NÉOFORMATION OSSEUSE avec BCP-MOT est **QUALITATIVEMENT ET QUANTITATIVEMENT SUPÉRIEURE** par rapport au BCP SEUL ou aux associations BCP-MOT-CSM différenciées ou non différenciées.



DISCUSSION

L'addition de CSM à l'association BCP-MOT n'améliore pas la néoformation osseuse en territoire irradié :

- Compétition entre les cellules de la MOT et les CSM?
- Nombre de CSM trop important → dilution des cellules de la MOT?
- Rôle anti-inflammatoire des CSM supérieur au rôle ostéoprogéniteur?

Mise en évidence :

- pauvreté cellulaire du tissu osseux irradié
- rôle primordial de la vascularisation dans la néoformation osseuse

CONCLUSION

1ère étude à tester l'adjonction des CSM à l'association BCP-MOT : Ajout de CSM → pas d'amélioration de la néoformation osseuse

→ **BCP+MOT reste donc le MEILLEUR MATERIAU DE RECONSTITUTION OSSEUSE EN TERRITOIRE IRRADIÉ**

↳ apport d'éléments cellulaires et vasculaires pour la néoformation tissulaire et osseuse

→ Mise en évidence de la **PAUVRETÉ CELLULAIRE ET DE L'INSUFFISANCE DE VASCULARISATION DU TISSU OSSEUX IRRADIÉ**

↳ perspectives : **DEVELOPPEMENT DE LA NÉO-VASCULARISATION**

AMÉLIORATION DES PROTHÈSES MAXILLO-FACIALES

Malard O. et al. (2005) Bone; 36(2):323-330
Leroussel E. et al. (2006) Biomaterials; 27(26):4566-4572.
Espitalier F. et al. (2009) Biomaterials; 30(5):763-769 (1):37-42



Ce travail a été réalisé avec le concours de la ligue contre le cancer et de l'Agence de biomédecine.



Evaluation de l'empreinte parentale dans la lignée ES de singe Rhésus LYON-ES1 et après différenciation en précurseurs neuronaux et cellules neuronales in vitro ou in vivo

Annick LEFEVRE (INSERM U846, Institut Cellule Souche et Cerveau)

La thérapie régénératrice par cellules souches représente un espoir pour les nombreux patients atteints de maladies et de lésions dégénératives. La maladie de Parkinson se prête particulièrement bien à la stratégie d'implantation de cellules souches, et en raison du vieillissement de la population mondiale, l'importance de cette maladie comme problème de santé publique devrait s'accroître. L'utilisation de neurones dopaminergiques générés à partir de cellules ES apparaît comme une thérapie séduisante ; en effet, les cellules ES semblent avoir un avantage décisif par rapport aux autres types de cellules souches, en particulier adultes, du fait de leur plus grande plasticité. Les protocoles d'obtention des cellules ES et de leur différenciation font une large place à la culture in vitro, et la question essentielle, avant toute application clinique, est de savoir si l'épigénome des cellules est préservé au cours de tout ce processus. On sait en particulier que l'empreinte parentale est très sensible aux conditions de culture. Or, des altérations de l'empreinte parentale sont associées à de nombreux cancers chez l'homme. L'empreinte parentale des cellules ES est-elle susceptible d'être altérée par les cultures in vitro intensives (culture et repiquages successifs), leur différenciation en précurseurs neuronaux in vitro, le stress que constitue une greffe dans le cerveau et l'adaptation à un nouvel environnement ... ? L'unité Inserm U846 a développé un modèle de singe Rhésus parkinsonien permettant de tester la validité et l'efficacité thérapeutique d'une stratégie de remplacement cellulaire utilisant les cellules ES. F Wianny et C Dehay ont dérivé une nouvelle lignée de cellules ES chez le singe Rhésus, la lignée LYON- ES1 capable de se différencier en précurseurs neuronaux in vitro qui peuvent être greffés dans le cerveau de singe Rhésus traité au MPTP.

Notre projet est d'évaluer l'impact de différents processus, culture in vitro, sur supports artificiels, différenciation in vitro ou in vivo après greffe dans le cerveau de précurseurs neuronaux, sur la qualité de l'empreinte parentale des cellules ES et de leurs dérivés différenciés. Pour cela, nous analyserons le profil de méthylation de 2 centres d'empreinte témoins, l'un soumis à empreinte maternelle, snrpn, l'autre soumis à empreinte paternelle, H19/Igf2, et l'expression monoallélique des gènes qu'ils contrôlent (snrpn, H19 et Igf2). Cette étude devrait permettre de définir les meilleures conditions de culture, de différenciation et de greffe des cellules ES et de leurs dérivés différenciés pour que leur épigénome soit préservé dans l'hypothèse d'une application clinique sécurisée. Les enseignements que nous tirerons de nos expériences avec la lignée ES de primate seront précieux pour passer à l'étude d'autres types de cellules souches, adultes en particulier qui doivent subir un remodelage épigénétique important pour revenir à un état indifférencié.

Publication :

Mahendra A, Peyron I, Thaumat O, Dollinger C, Gilardin L, Sharma M, et al. Generation of Catalytic Antibodies Is an Intrinsic Property of an Individual's Immune System: A Study on a Large Cohort of Renal Transplant Patients. *The Journal of Immunology*. 15 mai 2016;196(10):4075-81.

Diagnostic biologique du rejet après transplantation cardiaque dans la cohorte multicentrique française CALCICOEUR

Robert BAROUKI (Service de Biochimie Métabolique, Hôpital Necker – Enfants Malades)

Objectifs : Nous avons initié une étude afin 1) d'évaluer l'activité de la calcineurine en tant que marqueur d'efficacité de la prophylaxie du rejet au cours des 2 premières années qui suivent la transplantation cardiaque, et 2) d'établir une banque de protéines et d'ARN (calcicoeur, PHRC P051066, Agence de la Biomédecine RAB3). Le financement accordé ne concernait que les 6 premiers mois de suivi des patients. La présente demande vise à financer les 18 mois suivants de l'étude et à utiliser la collection biologique constituée pour accroître nos connaissances sur la physiopathologie des réponses immunitaires après transplantation cardiaque.

Objectif principal : Rechercher une relation entre l'activité de la calcineurine et la survenue du rejet chronique et sa gravité, entre 6 et 24 mois après la greffe.

Objectifs secondaires : Elargir nos connaissances sur la physiopathologie des réponses immunitaires après transplantation cardiaque, notamment au niveau 1) des différentes étapes de l'activation lymphocytaire (profil d'expression de la calcineurine et de NFATc1-4 au niveau génique et protéique, profil d'expression des voies de signalisation et profil d'expression d'un panel de nouveaux biomarqueurs potentiels du rejet), 2) du stress oxydant induit après la transplantation et 3) de l'expression du récepteur aux aryl hydrocarbures (AhR) qui a été récemment identifié comme étant une cible thérapeutique immunomodulatrice prometteuse.

Résultats attendus : Cette étude nous permettra 1) d'établir la valeur informationnelle de l'activité de la calcineurine sur le rejet chronique par l'AUC ROC, 2) de déterminer le seuil diagnostique optimal de l'activité de la calcineurine et 3) d'établir les valeurs informationnelles des différents biomarqueurs appréciés dans cette étude sur le rejet par l'AUC ROC.

Méthodologie : L'étude calcicoeur est une étude biologique multicentrique ouverte chez 100 patients. Des prélèvements sanguins sont effectués avant greffe, puis 3 fois/semaine jusqu'à J30, 1 fois/semaine jusqu'au 3ème mois et 1 fois/quinzaine jusqu'au 24ème mois après la greffe pour la détermination de l'activité de la calcineurine et l'établissement de la banque de protéines et d'ARN. Le profil d'expression des biomarqueurs, qui font l'objet de la présente demande, sera déterminé sur les prélèvements de cette collection biologique ainsi constituée. Les principaux critères d'inclusion sont des patients majeurs devant bénéficier d'une transplantation cardiaque et recevant une prophylaxie du rejet à base de tacrolimus ou de ciclosporine, et les principaux critères de non-inclusion sont des patients à distance de la transplantation.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

EVALUATION OF CALCINEURIN ACTIVITY AS A BIOMARKER OF THE STATE OF IMMUNOSUPPRESSION IN HEART TRANSPLANTATION

S. Sanquer¹, S. Varnous², E. Vermes³, C. Lena¹, L. Herry¹, R. Niarra⁴, R. Guillemain⁴, R. Barouki³, C. Amrein⁴
¹Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; ²Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France;
³Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France; ⁴HEGP, AP-HP, Paris, France

Introduction

Heart transplantation (HTx) is nowadays a valid therapeutic option in end-stage heart diseases for selected patients and in specific conditions. The standard for rejection prevention in HTx includes a calcineurin inhibitor (CNI), such as cyclosporine and tacrolimus, that constitutes the cornerstone of immunosuppression (IS), but the optimal balance of IS is difficult to achieve following transplantation. Indeed, inadequate IS with insufficient therapy may lead to rejection, whereas excessive IS would facilitate the development of infections and malignancy. The current monitoring of IS, which is performed through CNI blood levels is not entirely satisfactory. Therefore, we have developed a pharmacodynamic (PD) approach to monitor the extent of IS and circumvent possible adverse events. This PD approach is based on the measurement of calcineurin activity (CN-a), i.e. the target of CNIs. We have conducted two prospective observational clinical studies to monitor CN-a for the first 24 months following HTx and to investigate whether a relationship exists between CN-a, rejection and severe complications related to over-IS.

Methods

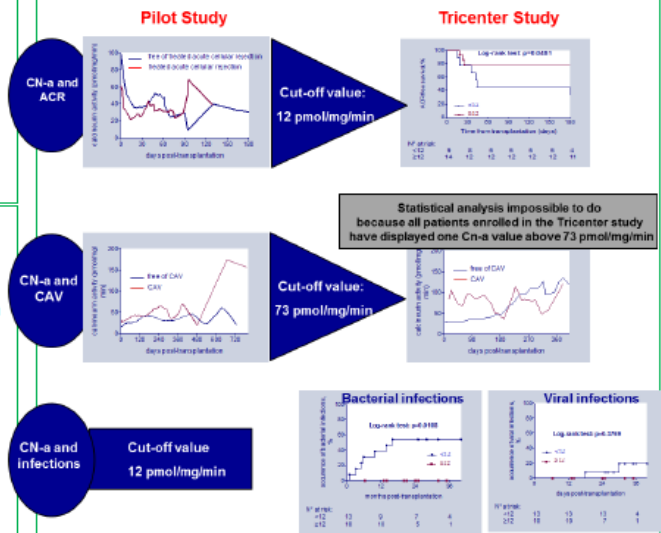
- Patients were eligible if their IS treatment included cyclosporine. A Pilot monocenter study was first conducted in which 56 patients were enrolled and for whom CN-a was measured once a month during the first 6 months after HTx and then every 3 months.
- Then, a Tricenter study was conducted in which 23 patients were enrolled and for whom CN-a was measured at a higher frequency than in the Pilot study.
- Endomyocardial biopsies were routinely performed to assess acute cellular rejection (ACR). Coronary angiography was yearly performed to assess chronic rejection/chronic allograft vasculopathy (CAV).
- Threshold values for CN-a were determined in the Pilot study (15th and 90th percentiles), and were tested in the Tricenter study.

Results

Low CN-a values were associated with Acute Cellular Rejection: a threshold value of 12 pmol/mg/min was determined in the Pilot study. This cut-off was confirmed in the Tricenter with a significant lower survival without ACR for patients who displayed CN-a values below 12 pmol/mg/min. The presence of a low threshold associated with the occurrence of ACR was not anticipated since very low CN-a levels should have been associated with a strong protection against Lymphocyte activation. In fact, the patients with low CN-a levels were, indeed, strongly immunosuppressed since they developed a higher rate of bacterial infections and a trend for a higher rate of viral infections as compared to patients with higher CN-a levels.

Results

In contrast to the association of CN-a with Acute Cellular Rejection, only an upper threshold for CN-a levels sound to be associated with a higher risk of developing chronic rejection/CAV. As expected, high CN-a levels could reflect poor immunosuppression that is not sufficient to counteract the immunogenic activation of T lymphocytes. The exact value of this upper threshold will be further determined in a trial with a larger cohort of patients.



Conclusions

These findings are similar to those we have recently reported in lung transplant recipients (Sanquer et al, Plos One 2013) with in particular, a paradoxical association between very low CN-a levels and the development of acute cellular rejection. These results suggest that calcineurin activity could be a biomarker of the degree of immunosuppression and could be useful to reduce both the occurrence of rejection related to an inadequate immunosuppression and the development of severe complications related to exceedingly immunosuppression.

Transplantation orthotopique expérimentale de cœurs prélevés arrêtés. Intérêt du post-conditionnement au moment de la reperfusion

René FERRERA (INSERM U886, Laboratoire de Physiologie – Faculté de Médecine Lyon Nord)

Le manque crucial d'organe est responsable de la première cause de mortalité en transplantation cardiaque : ceux qui décèdent avant la transplantation faute de greffons.

- Un certain nombre de cœurs humains sont non utilisés, c'est-à-dire actuellement refusés pour la greffe. Ce sont les cœurs arrêtés au moment du prélèvement et les cœurs dits "douteux", par exemple ceux qui ont une fonction hémodynamique trop instable au cours de la mort cérébrale ou encore ceux qui ont dépassé la période de 4-6 heures de préservation froide, bref il s'agit là de greffons dont on ignore le potentiel de viabilité.
- Une méthode fiable d'évaluation du greffon est donc indispensable pour sécuriser le prélèvement de cœurs douteux ou arrêtés.

Objectifs - Résultats attendus

L'objectif de cette étude est triple :

- Il s'agit d'une part de tenter de transplanter des cœurs de porc, prélevés arrêtés après une période d'ischémie chaude globale de 10 ou 20 minutes. Le but de ce premier travail est de déterminer la limite de tolérance à l'ischémie chaude du greffon cardiaque.
- D'autre part, sur ces greffons et avant transplantation nous rechercherons des indices fiables de viabilité, en particulier l'analyse des résistances coronaires et les niveaux énergétiques intra-tissulaires.
- Enfin, nous tenterons de savoir si l'on peut efficacement protéger les greffons cardiaques prélevés arrêtés grâce à un postconditionnement pharmacologique (cyclosporine) administré au moment de la reperfusion.

Publication :

Ferrera R, Benhabbouche S, Da Silva CC, Alam MR, Ovize M. Delayed low pressure at reperfusion: A new approach for cardioprotection. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 1 déc 2015;150(6):1641-1648.e2.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

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

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

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

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

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

Objectifs

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

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

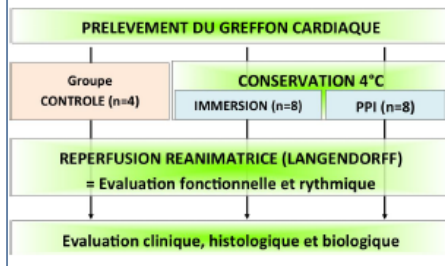
Méthodologie

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

Fonctionnement du dispositif PPI:



Protocole expérimental:



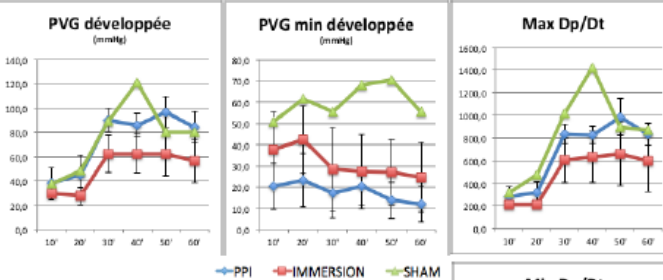
Résultats

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

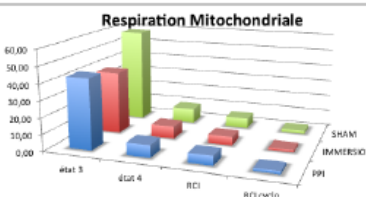
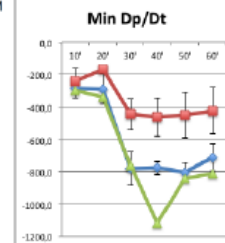
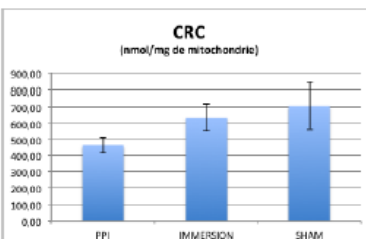
Résultats sur la préservation :

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

Résultats sur les propriétés contractiles au cours de la réanimation :



Résultats sur les fonctions mitochondriales:



Conclusion

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

Rôle de l'alloréaction humorale dans le développement de la vasculopathie de transplantation

Nathalie AUGÉ (INSERM, U858/I2MR, CHU Ranguéil)

La vasculopathie de transplantation (VT) ou artériosclérose de greffe, est une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les patients transplantés. Elle se caractérise par un épaississement concentrique au niveau des vaisseaux du greffon, aboutissant à une ischémie chronique et au rejet de l'organe. La pathogénie de cette affection n'est pas définie et il n'existe pas de traitement efficace permettant de prévenir l'hyperplasie néointimale. Le système immunitaire, notamment l'alloréaction humorale dirigée contre le système HLA de classe I du greffon est impliqué dans la VT. La survenue de la VT est plus fréquente chez les patients ayant développé des anticorps anti-HLA (en particulier, anti-HLA de classe I). De plus, les anticorps anti-HLA de classe I sont mitogènes *in vitro* pour les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) en culture.

Notre projet est d'étudier les mécanismes impliqués dans la prolifération des CML induite par les anticorps anti-HLA classe I. L'hypothèse est que ces anticorps, comme divers agents de stress, activent une (ou plusieurs) voies mitogènes impliquant des métalloprotéases (MT1-MMP et MMP2), et la voie des sphingolipides, dont le rôle dans la prolifération des CML a été récemment décrit par notre équipe. Les études préliminaires montrent que les anticorps anti-HLA de classe I activent cette voie métalloprotéases/sphingolipides sur les CML en culture. Par ailleurs, nous avons développé un modèle de VT chez des souris immuno-déficientes SCID/Beige, greffée avec des segments d'artères mésentériques humaines en position d'aorte infrarénale, et traitées par des anticorps anti-HLA de classe I (Galvani et al. 2009). Ces anticorps anti-HLA induisent le développement d'une hyperplasie intimale au niveau du greffon d'artère humaine.

Notre objectif est d'étudier i/ l'implication la voie de signalisation métalloprotéases/sphingolipides dans la prolifération des CML induite par les anticorps anti-HLA de classe I, ii/ comment la fixation des anticorps sur les molécules HLA-I des CML active la signalisation mitogène, iii/ quels sont les médiateurs et les acteurs moléculaires situés en amont de la voie métalloprotéases/sphingolipides; iv/ les liens éventuels entre la voie métalloprotéases/sphingolipides et la voie PI3K/Akt/mTOR, elle aussi activée par les anticorps anti-HLA-I. Ces études seront validées sur des artères humaines maintenues en culture organotypique et stimulées *ex vivo* par les anticorps anti-HLA-I. L'évaluation du rôle de cette voie de stress dans la VT sera aussi réalisée *in vivo* dans le modèle de souris SCID/Beige greffées avec des segments d'artère humaine et traitées par des anticorps anti-HLA-I. Par ailleurs, nous testerons l'effet d'inhibiteurs des métalloprotéases ou des sphingolipides sur l'hyperplasie intimale. Enfin, nous effectuerons des études cliniques chez des patients transplantés rénaux ayant ou non développés des anticorps contre le greffon afin de voir une éventuelle corrélation entre la présence de ces anticorps et l'augmentation de MMP2 et S1P plasmatique.

Les résultats attendus devraient montrer que les MMPs et la S1P sont impliquées dans le mécanisme de VT, et que la VT peut être prévenu par des inhibiteurs pharmacologiques de ces voies de signalisation.

Ce modèle devrait permettre de mieux comprendre certains mécanismes moléculaires de VT, de proposer de nouvelles approches thérapeutiques, et de nouveaux marqueurs plasmatiques (MMP2, S1P) pour le suivi des patients transplantés.

Publication :

Galvani S, Trayssac M, Auge N, Thiers J-C, Calise D, Krell H-W, et al. A Key Role for Matrix Metalloproteinases and Neutral Sphingomyelinase-2 in Transplant Vasculopathy Triggered by Anti-HLA Antibody. *Circulation*. 13 déc 2011;124(24):2725-34.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Role of MMPs and nSMase in transplant vasculopathy induced by HLA class I antibodies

Trayssac M¹, Galvani S¹, Augé N¹, Calise D², Sallusto F³, Krell HW⁴, Kamar N³, Rostaing L³, Thomsen M¹, Nègre-Salvayre A¹, Salvayre R¹

¹ INSERM/ UPS UMR U1048 / I2MC -Team "Atherosclerosis-Graft Arteriosclerosis" –, ² Experimental Microsurgery, IFR150 Rangueil
³ Department of Multiorgan Transplantation, CHU Rangueil, Toulouse, France, ⁴ Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

Objectives

The role of human leucocyte antigens (HLA) class I antibodies in transplant vasculopathy has been described, pointing out a role for humoral response in chronic vascular rejection (CVR) (1).

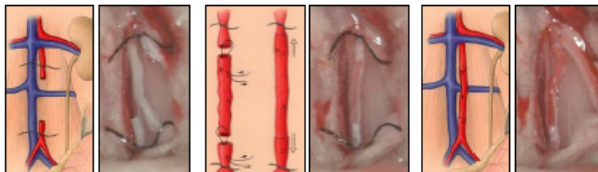
We recently developed an animal model for transplant vasculopathy consisting in immunodeficient SCID/beige mice grafted at the infrarenal aortic position with a human mesenteric artery and weekly injected with HLA class I antibodies. In a few weeks, these mice develop a significant neointimal hyperplasia in the grafted artery due to smooth muscle cell (SMC) proliferation (2).

The present work was carried out for deciphering the mechanism by which HLA class I promote SMC proliferation in vitro and in vivo. We focused our study on matrix metalloproteinases (MMPs) and neutral sphingomyelinase (nSMase) known to be involved in a proliferative signaling pathway (3).

Methods

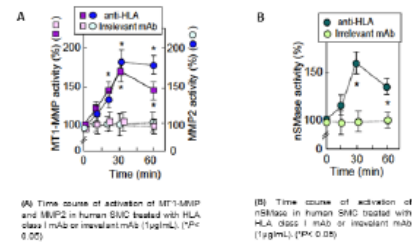
In vitro, we used human SMC CRL-1999. Activities were measured by enzymatic tests on culture medium or cell lysate. ³H thymidine incorporation was used to quantify cell proliferation.

In vivo/ the animal model consists in grafting human mesenteric artery at the infrarenal aortic position of SCID/beige mice. After transplantation, mice weekly receive intravenous injection of irrelevant or HLA class I antibodies. Six weeks later, mice were sacrificed and human graft was analysed by histomorphological studies.

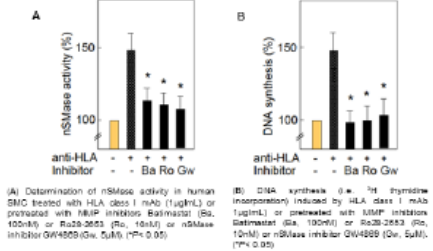


Results

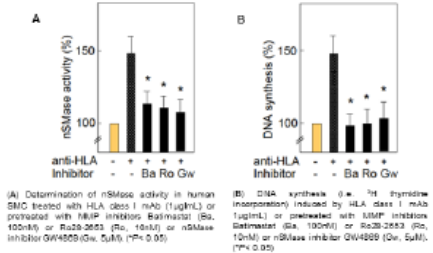
Results – I. HLA class I antibodies trigger activation of MT1-MMP, MMP2 and nSMase in human SMC



Results – II. The proliferative effect of HLA class I antibodies in human SMC is inhibited by MMPs and nSMase inhibitors



Results – III. The proliferative effect of HLA class I antibodies in human SMC is inhibited by MMPs and nSMase inhibitors



Conclusion: The reported data show that HLA class I antibodies induce SMC proliferation in vitro and in vivo. The proliferative effect of HLA class I antibodies involved the activation of MMPs and nSMase. Pharmacological inhibitors of MMPs and nSMase prevent mice from intimal hyperplasia induced by HLA class I antibodies. These results highlight a crucial role for MMPs and nSMase in SMC proliferation and transplant vasculopathy elicited by humoral immune response and opens new possibilities for the treatment of chronic vascular rejection.

References :
1/ Wehner et al, *Circ Res.* 2007; 100:191-203
2/ Galvani et al, *Am J Transplant.* 2009; 9:2607-2614
3/ Augé et al, *Circulation.* 2004; 110 : 571-578

Développement d'une méthode d'évaluation de la qualité des greffons par spectroscopie infrarouge pour les transplantations hépatiques

François LE NAOUR (INSERM U785, Villejuif)

Le foie est le siège de diverses pathologies chroniques telles que la stéatose ou les hépatites chroniques qui conduisent progressivement à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire (CHC). L'un des traitements de la cirrhose avec ou sans CHC est la transplantation hépatique. Le manque de greffons conduit les équipes de transplantation à employer des organes obtenus sur des donneurs à cœur arrêté. Cette pratique est possible en France depuis 2006. Les donneurs à cœur arrêté constituent une source additionnelle d'organes mais également un facteur de risque de complications pour le patient receveur. En effet, le contrôle de la qualité des greffons est actuellement réalisé par l'estimation extemporanée du pourcentage de stéatose sur coupe de tissu, ce qui est imprécis et peu reproductible. Le seuil de stéatose recommandé par l'Agence de la Biomédecine pour des greffons de foie obtenus à partir de donneur à cœur arrêté est de l'ordre de 20%. Cette recommandation drastique contraste avec l'incapacité des méthodes actuelles à évaluer rigoureusement et quantitativement le taux de stéatose. La difficulté des chirurgiens et des pathologistes à déterminer la qualité d'un foie est un écueil majeur non seulement pour les transplantations hépatiques, mais aussi pour la chirurgie du foie en général. La possibilité d'appréhender la composition biochimique globale d'un tissu par des approches spectroscopiques peut conduire à caractériser des signatures spectrales de la qualité d'un tissu. Une étude exploratoire, soutenue et financée pendant un an par le PRES UniverSud Paris, a été initiée sur la stéatose. Des analyses tissulaires par spectroscopie infrarouge (IR) à l'aide du rayonnement du synchrotron SOLEIL ont été réalisées sur des coupes congelées d'échantillons hépatiques. L'étude a démontré que la microspectroscopie IR permet de détecter des états pathologiques précoces. L'objectif de ce projet est de mettre en place un programme de recherche translationnelle du synchrotron SOLEIL vers l'Hôpital pour développer une méthode quantitative d'évaluation de la qualité des greffons dans le cadre de la transplantation hépatique. Cet objectif sera attiré par la réalisation de trois tâches: 1- la collecte prospective de biopsies de greffons obtenus dans des conditions standardisées lors de transplantations hépatiques; 2- le développement d'une méthode permettant d'évaluer de manière quantitative la stéatose et d'identifier des signatures spectrales en rapport avec la qualité du tissu; 3- le transfert des méthodes développées au synchrotron SOLEIL sur un microscope IR commercial et l'implantation de ce microscope au Centre Hépatobiliaire (CHB, Villejuif), pour une utilisation clinique. La méthode sera rapide, sensible, robuste, peu coûteuse, simple d'utilisation et quantitative. Elle sera utilisable sur des microscopes IR commerciaux et applicable dans n'importe quel centre de transplantation hépatique.

Publications :

1. Le Naour F, Gadea L, Danulot M, Yousef I, Vibert E, Wavelet M, et al. Quantitative Assessment of Liver Steatosis on Tissue Section Using Infrared Spectroscopy. *Gastroenterology*. févr 2015;148(2):295-7.
2. Peng C, Chiappini F, Kaščáková S, Danulot M, Sandt C, Samuel D, et al. Vibrational signatures to discriminate liver steatosis grades. *The Analyst*. 2015;140(4):1107-18.

Développement d'un substitut méniscal cellularisé à partir d'une matrice inerte et de cellules souches mésenchymateuses

Pascal DELEPINE (EFS Bretagne)

Contexte : Les ménisques sont des fibrocartilages retrouvés dans plusieurs articulations du corps humain. Au niveau de l'articulation du genou ils présentent une structure semi-lunaire interposée entre condyles fémoraux et plateaux tibiaux. Ils améliorent ainsi la congruence articulaire.

Une étude scandinave fixe l'incidence des lésions méniscales à 9/10 000 habitants chez les hommes. En France plus de 200 000 gestes méniscaux sont réalisés chaque année en chirurgie (le plus souvent au cours d'une arthroscopie pour syndrome méniscal (environ 175000), sinon au décours de plasties ligamentaires).

Toute méniscectomie, même partielle, est à même de perturber le fonctionnement biomécanique du genou et donc de générer de l'usure d'autant plus s'il existe une laxité ligamentaire associée.

L'évolution des moyens thérapeutiques a tenu compte de ces notions biomécaniques et les méniscectomies systématiques ont fait place aux méniscectomies partielles ; les réparations méniscales doivent être réalisées chaque fois que possible mais sont plutôt réservées aux lésions traumatiques. Le remplacement ou greffe méniscale reste rare. Ses indications sont limitées, à l'heure actuelle, aux genoux douloureux après méniscectomie avec capital cartilagineux préservé et sans instabilité ligamentaire.

La préservation méniscale est une priorité mais elle n'est pas toujours possible. Dès lors le remplacement reste la seule solution. Les difficultés techniques sont nombreuses, et les allogreffes posent des problèmes difficilement solvables. Le recours à l'ingénierie tissulaire permet d'envisager des perspectives favorables mais nécessitent non seulement d'approcher les propriétés mécaniques mais également histologiques du tissu méniscal.

Objectif : Ce projet a pour objectif de réaliser une matrice cellularisée qui reproduise au mieux les caractéristiques et propriétés d'un ménisque sains afin de supporter au mieux les contraintes subies normalement par le ménisque.

Méthodologie : Le programme présenté comprend l'évaluation de deux types de supports, le premier inerte et d'origine artificiel, le second correspond à un ménisque décellularisé et sécurisé du point de vue biologique. Nous pensons pouvoir coloniser ces supports au moyen d'un ou deux types cellulaires. Les cellules souches mésenchymateuses sont un candidat très pertinent au vue des potentialités dont elles font preuves et qui sont largement décrites dans la littérature. Cependant les cellules progénitrices CD34+ pourraient être à considérer notamment en association aux CSM, du fait de leur présence dans le ménisque sain. Le support colonisé sera soumis à différents types de contraintes de façon à conditionner au mieux l'ensemble.

Résultats attendus : En reproduisant ainsi l'architecture et la cellularité d'un ménisque, nous pensons pouvoir créer un substitut méniscal dont l'inexistence actuelle fait cruellement défaut et à des conséquences socio-économiques non négligeables.

Analyse phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B chez des patients tolérants un greffon rénal

Jean-Paul SOULILLOU (ITERT - INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, Nantes)

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la transplantation d'organes, la morbidité et la mortalité restent beaucoup plus élevées dans la population de patients transplantés que dans la population générale. Ceci est principalement dû aux effets secondaires des immunosuppresseurs et au phénomène de rejet. Ainsi l'un des objectifs des chercheurs en transplantation aujourd'hui est l'induction d'une tolérance spécifique du greffon qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur. Alors que ce processus de tolérance a été maintes fois décrit dans des modèles animaux, il reste rare en clinique. Pourtant, 30% des patients ayant reçu un greffon hépatique et inclus dans un protocole de minimisation de traitement immunosuppresseur tolèrent leur greffon après arrêt total des traitements et de tels cas ont été décrits en transplantation rénale après arrêt spontanée des immunosuppresseurs. Ces dix dernières années, des efforts importants ont été faits en transplantation et ceci principalement via la mise en place de programmes européens (*Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance and Indices of Tolerance*) et américains (*Immune Tolerance Network*) dans la recherche de signature biologique de la tolérance. Depuis maintenant plusieurs années, et à travers ces réseaux notamment, nous avons créé une banque d'échantillons biologiques (PBMC, urine, cellules) regroupant 25 patients transplantés rénaux présentant un tel état de tolérance. Nous avons analysé le sang périphérique de ces patients et notamment nous avons montré que ces patients présentaient une augmentation du nombre de leurs lymphocytes B en périphérie par rapport aux autres patients transplantés présentant des situations cliniques différentes (fonction stable sous immunosuppression, rejet chronique). Ces lymphocytes présentent un profil particulier dit « pseudo-mémoire » et expriment des molécules d'inhibition (FcγRIIb, BANK1). Par ailleurs, ces mêmes patients présentent un déficit en plasmocytes et un profil de type IgG4, une immunoglobuline incapable de fixer de façon efficace le complément.

Nous faisons ainsi l'hypothèse que les lymphocytes B périphériques de ces patients au profil particulier sont impliqués dans ce processus de tolérance. L'objectif de ce projet est donc de caractériser précisément ces lymphocytes B/ plasmocytes, d'en étudier la fonction (prolifération, production en cytokines, suppression, apoptose) et les processus de différenciation (expression de molécules particulières, switch des immunoglobulines).

Publication :

Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, et al. Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients: B Cell Differentiation in Tolerance. *American Journal of Transplantation*. janv 2014;14(1):144-55.

Protocolisation de la restitution du visage du donneur lors des prélèvements des ATC faciaux

Bernard DEVAUCHELLE (Service de chirurgie maxillofaciale, CHU Amiens)

L'obligation légale de restitution du corps du donneur d'organe à la famille impose, en cas de prélèvement d'allogreffe de tissus composites (ATC) du visage, une reconstitution très élaborée.

A partir de l'expérience des deux ATC réalisées par l'équipe porteur du projet, protocoliser cette réhabilitation par une série de 20 dissections et reconstructions prothétiques, dont chaque étape sera analysée et évaluée (en terme de temps et de qualité), constitue l'objectif premier de cette étude. Au-delà, informer les équipes en charge de la coordination des contraintes, possibilités et obligations liées aux ATC du visage facilitera leurs relations avec l'entourage des donneurs potentiels.

Cette étude, initiée par l'Institut Faire Faces (IFF-Pr DEVAUCHELLE), menée en collaboration avec l'UPJV (Laboratoire d'anatomie et d'organogénèse - Pr LE GARS), l'Université Catholique de Louvain (UCL – Laboratoire d'anatomie et de morphogénèse – Pr LENGELE), le Service de Chirurgie Maxillo-Faciale (CHU d'Amiens – Pr DEVAUCHELLE), s'inscrit dans le droit fil du PHRC national consacré aux ATC de la face déposé en 2006 et répond aux objectifs d'IFF à l'égard du handicap. La crédibilité des résultats attendus repose sur la rigueur et la méthodologie mises en œuvre et la possibilité offerte d'effectuer à distance une seconde évaluation grâce à la conservation des documents d'analyse. Elle pourrait conduire à l'élaboration de recommandations concernant la reconstitution de la face du donneur : technique et conditions.

Stratégie de préservation de CREB afin d'améliorer la survie et la fonction des îlots pancréatiques humains isolés pour la greffe

Anne WOJTUSCISZYN (IRB Hôpital Saint Eloi, Laboratoire de thérapie cellulaire du diabète, Montpellier)

La greffe d'îlots pancréatiques est un traitement du diabète type 1 validé tant pour le patient présentant une instabilité glycémique sévère que pour le patient déjà transplanté rénal (1-3). Cette technique permet l'obtention de très bons résultats métaboliques sans les complications post-opératoires parfois majeures observées avec la greffe de pancréas entier. Cependant, le nombre de patients insulino-indépendants à moyen terme reste restreint (4). Deux phénomènes principaux limitent la viabilité et la fonction des îlots greffés : 1) le stress inflammatoire lors de l'isolement à partir du pancréas entier: il limite le nombre d'îlots viables isolés; 2) le phénomène thrombotique et inflammatoire nommé IBMIR survenant lors de la greffe intra-portale en elle-même, responsable d'une apoptose des îlots greffés (5). La réduction de la masse fonctionnelle greffée rend souvent nécessaire l'infusion d'îlots provenant de deux donneurs pour un receveur. L'amélioration du « rendement » de l'isolement et de la greffe d'îlots est donc un objectif essentiel pour développer cette thérapeutique.

Le GLP-1 est un peptide intestinal utilisé en clinique pour amplifier la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques chez le diabétique de type 2. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré le rôle protecteur du GLP-1 sur la fonction des îlots en culture et après transplantation (6). Le GLP-1 protège également la cellule bêta de l'apoptose induite par les cytokines pro-inflammatoires (7). Ce peptide agit en stimulant l'expression de CREB, un facteur de transcription essentiel pour le maintien de la survie et de la fonction des cellules bêta (8). Nos travaux préliminaires mettent en évidence la dégradation de CREB dans les îlots fraîchement isolés avec une restauration de son expression après culture. CREB est dégradé en condition d'hypoxie chronique (9), d'inflammation aiguë (10) ou de traitement par immunosuppresseur (11). Pour toutes ces raisons, préserver l'intégrité fonctionnelle de CREB dans les îlots avant et/ou après transplantation semble essentiel.

In vitro, nous avons montré que le traitement d'îlots humains avec un peptide original (tat-CREB) bloquant la dégradation protéasomale de CREB empêche l'apoptose des îlots en conditions hyperglycémiques (12). Notre hypothèse est que l'augmentation de la fonction de CREB, par augmentation de son expression induite par le GLP-1 ou par inhibition de sa dégradation grâce à tat-CREB, permet d'améliorer la survie et la fonction des îlots. L'association de ces 2 stratégies pourrait mettre en évidence un effet additif ou synergique de tat-CREB et du GLP-1. Les expériences seront réalisées *in vitro* sur des îlots humains isolés et traités dont on évaluera la fonction sécrétrice et le niveau d'apoptose. En parallèle, *in vivo*, des greffes d'îlots humains traités par nos molécules seront réalisées chez la souris. L'amélioration de la survie et fonction des îlots traités devrait permettre à une quantité plus importante d'îlots de survivre à la greffe. La correction de l'hyperglycémie chez les souris diabétiques greffées devrait donc être plus rapide et la réversion du diabète plus fréquente et plus durable.

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

Thérapie génique ex vivo de progéniteurs hépatiques reprogrammés à partir de fibroblastes humains déficients en récepteur aux LDL

Anne WEBER (INSERM ADR PARIS XI)

La reprogrammation de fibroblastes, en cellules pluripotentes (iPSC= induced Pluripotent Stem Cells) permet d'envisager des applications thérapeutiques à terme le traitement de certaines maladies métaboliques sévères du foie. En effet, du fait du manque de donneur et les hépatocytes ne pouvant être amplifiés in vitro, la génération d'hépatocytes à partir de fibroblastes de patients permettrait d'avoir une source importante de cellules. La thérapie génique ex vivo permettrait de s'affranchir des problèmes liés à l'immunosuppression.

Objectifs : générer des cellules induites pluripotentes (iPS) à l'aide de vecteurs rétroviraux exprimant Sox2, Klf4, Nanog, c-Myc à partir de fibroblastes déficients, pour le récepteur aux LDL (RLDL), modèle de l'Hypercholestérolémie familiale ; les différencier en progéniteurs hépatiques, et évaluer la correction phénotypique après transfert lentiviral de l'ADNc du RLDL humain ; évaluer le potentiel de vecteurs lentiviraux non intégratifs à générer des iPS.

Résultats attendus :

- dériver des lignées d'iPSC générées à partir de fibroblastes déficients
- évaluer la différenciation en progéniteurs hépatiques et la correction in vitro du déficit
- déterminer si les vecteurs lentiviraux non intégratifs perdurent suffisamment longtemps dans la cellule hôte pour que la reprogrammation des fibroblastes s'effectue.

Méthodologie :

Les fibroblastes humains déficients congelés au laboratoire seront transduits par des vecteurs rétroviraux (construits et produits par Vectalys, Toulouse) exprimant les 4 facteurs de pluripotence et les colonies cultivées selon les conditions mises au point par Dr L Vallier à Cambridge sur des fibroblastes normaux jusqu'à l'apparition des clones reprogrammés

- Les clones seront isolés et cultivés dans les conditions des cellules embryonnaires humaines développées à Cambridge et dans l'Unité et caractérisés pour leur pluripotence (expression de Nanog, SSEA4, Sox2, Oct 4, TRA-1-60, Phosphatase alcaline).

- Un clone sera transduit par le vecteur lentiviral construit au laboratoire APOA-II-RLDL et les cellules seront différenciées en progéniteurs hépatiques selon nos conditions, définies pour les cellules ES humaines (brevet).

- La population obtenue sera caractérisée pour l'expression de marqueurs hépatiques d'une part et pour la correction phénotypique par internalisation d'un ligand fluorescent du Récepteur : le Dil-LDL d'autre part.

- Des vecteurs lentiviraux non-intégratifs délétés dans le gène codant l'intégrase du virus HIV-1 et exprimant Sox2, Klf4, Nanog, c-Myc (construits et produits par Vectalys) seront utilisés pour transduire les fibroblastes humains. Les cellules seront transduites tous les 4 jours pendant 20 jours et les clones obtenus seront caractérisés pour leur pluripotence.

Publications :

1. Dianat N, Steichen C, Vallier L, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy. *Current gene therapy*. 2013;13(2):120.

2. Yang G, Si-Tayeb K, Corbineau S, Vernet R, Gayon R, Dianat N, et al. Integration-deficient lentivectors: an effective strategy to purify and differentiate human embryonic stem cell-derived hepatic progenitors. *BMC Biol*. 2013;11:86.

Thérapie cellulaire cardiaque : Utilisation de feuilles de cellules souches dans le traitement des cardiopathies non-ischémiques

Onnik AGBULUT (Université Paris Diderot, Paris 7 – Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative/CNRS EAC 4413)

L'insuffisance cardiaque représente un problème majeur de santé publique. Malgré les progrès accomplis en pharmacologie et en chirurgie, le pronostic demeure sévère, justifiant la recherche permanente d'options thérapeutiques nouvelles. La thérapie cellulaire s'inscrit en premier lieu en visant la régénération de zones myocardiques nécrosées. En effet, une greffe cardiaque de cellules somatiques adultes peut améliorer la fonction ventriculaire. Toutefois, on sait aujourd'hui que ce bénéfice procède principalement de mécanismes indirects (voie paracrine), et non de la génération de nouveaux éléments contractiles capables de former un syncytium avec les cardiomyocytes de l'hôte. Par contre, des données récentes de la littérature et notre propre expérience montrent que la greffe de cellules souches embryonnaires (CSE) permet la formation d'un syncytium et l'amélioration de la fonction ventriculaire.

Notre objectif principal est la mise au point d'un produit de thérapie cellulaire constitué par des feuilles de cellules pour un traitement des cardiomyopathies dilatées pour lesquelles la seule option radicale reste aujourd'hui la transplantation cardiaque.

L'utilisation de ces feuilles se justifie par le fait que le traitement se fera sur l'ensemble du ventricule et pas seulement au site d'injection. Ainsi, peut-on espérer augmenter la viabilité des cellules greffées en limitant la mort cellulaire inhérente à la dispersion des cellules lorsqu'elles sont injectées. Les feuilles sont formées par culture de CSE murines et de cellules souches mésenchymateuses autologues d'origine adipeuse sur des films thermosensibles. Aux premières revient la tâche de contribuer à la régénération du myocarde tandis que les secondes visent à apporter un support trophique optimisant la survie du greffon.

La greffe se fera par dépôt sur l'épicarde dans des modèles murins de cardiopathies non-ischémiques. Ces modèles sont créés par invalidation conditionnelle du facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'expression des gènes cardiaques.

La fonction cardiaque sera évaluée par échocardiographie avant la greffe et un mois plus tard. L'explantation des cœurs permettra une analyse immuno-histochimique visant à détecter les cellules greffées, à les quantifier et à préciser leurs phénotypes. La réalisation de ce projet constitue une des étapes pré-cliniques indispensables avant l'application chez l'homme de ces approches thérapeutiques.

Publications :

1. Hamdi H, Planat-Benard V, Bel A, Neamatalla H, Saccenti L, Calderon D, et al. Long-term functional benefits of epicardial patches as cell carriers. *Cell Transplant.* janv 2014;23(1):87-96.
2. Hamdi H, Boitard SE, Planat-Benard V, Pouly J, Neamatalla H, Joanne P, et al. Efficacy of epicardially delivered adipose stroma cell sheets in dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research.* 1 sept 2013;99(4):640-7.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

Efficacy of Epicardially Delivered Adipose Stromal Cell Sheets In Dilated Cardiomyopathy

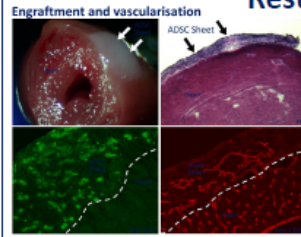
Hamdi H¹, Boitard S², Planat-Benard V³, Pouly J⁴, Nematalla H⁴, Joanne P², Perier MC¹, Bellamy V¹, Casteilla L³, Li Z², Mericskay M², Menasché P³, Agbulut O²

¹INSERM U970, Paris, France; ²UPMC, UMR CNRS 8256, Paris, France; ³UMR 5273 UPS, CNRS, Inserm U1031, STROMALab, Toulouse, France; ⁴Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France

Objectives

Cell retention in damaged hearts appears as one of the major hurdles for successful myocardial regeneration in stem cell therapy. Our recent study demonstrated that epicardial delivery of adipose derived stroma cell sheets results in greater post-infarction survival associated with better engraftment and preservation of left ventricular geometry than direct intramyocardial injections¹. Few studies have assessed the effects of cell therapy in non-ischemic cardiomyopathies which, however, contribute to a large number of cardiac failures. We assessed the effects of epicardially delivered adipose tissue-derived stroma cell (ADSC) sheets in a mouse model of dilated cardiomyopathy.

Results

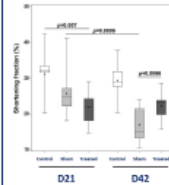


Three weeks after epicardial delivery, ADSC sheets were detected on the surface of the heart.

Grafted cells were identified using GFP immuno-staining (green). Numerous capillaries were detected in epicardially delivered ADSC sheets (red).

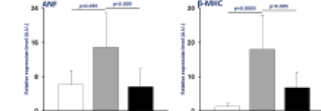
Improvement of heart function

Echocardiography



In the untreated group, shortening fraction declined after three weeks (D42), whereas the sheet application resulted in its stabilization (see left panel). This correlated with a lesser degree of LV remodeling (data not shown).

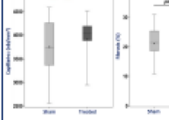
qPCR



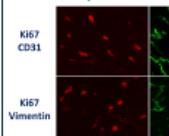
Treated animals also displayed a reduced expression of the stress-induced atrial natriuretic factor (ANF) and β-myosin heavy chain (β-MHC) genes at D42 (see panels above).

Remodeling and mechanisms

Angiogenesis

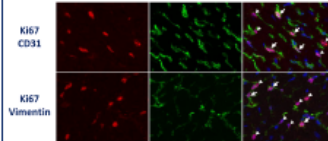


Sirius red



No differences were observed in angiogenesis (see first panel). However, we observed significant reduction of myocardial fibrosis (see second panel) confirmed by a decrease of Col1/Col3 ratio compared to sham mice (see third and fourth panels).

Identification of proliferative cells

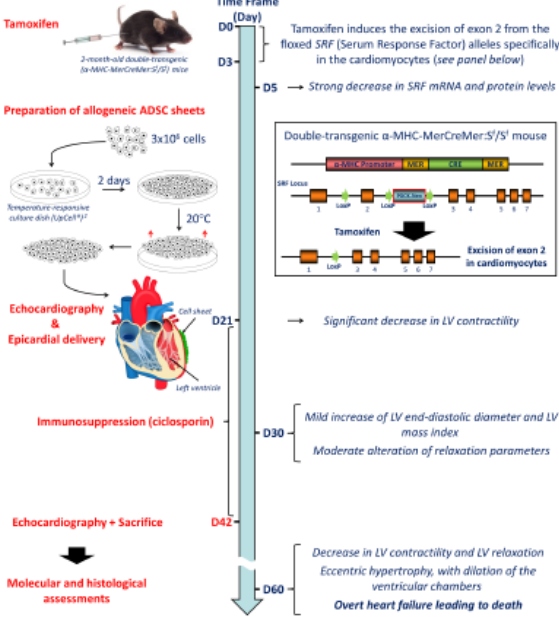


After treatment we observed a decrease of vimentin⁺ proliferative cells (myofibroblasts) while there is no difference concerning CD31⁺ positive proliferative cells (endothelial cells) in comparison to untreated animals.

Cytokines	Quantity
IFN-γ	+++
IL-1α	++
MMP-2	+++
P-selectin	+++
SCF	++
SDP-1α	+++
TIMP-2	++
VCAM-1	+++
VEGF	++

Conclusions: Application of the sheet resulted in a stabilization of the shortening fraction correlated with a lesser degree of LV remodeling. These protective effects were also accompanied by a reduction of myocardial fibrosis. These results strongly suggest the functional relevance of epicardially-delivered cells to non-ischemic heart failure

Methods



Experimental groups

- Three weeks after tamoxifen administration, mice were randomly allocated to:
- ✓ Control group (n=9, non-transgenic)
 - ✓ Sham group (n=10, transgenic untreated)
 - ✓ Treated group (n=10, transgenic treated with GFP-ADSC sheets, only for morphological studies)
 - ✓ Treated group (n=10, transgenic treated with ADSC sheets, for functional and mechanistic studies)