

**Résumés des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres
2016 « Recherche et Greffe »**

Sujet de recherche	Thème	Chercheur	Subvention accordée
Les mastocytes sont-ils impliqués via HLA-G dans la survie du greffon en transplantation hépatique	5	AMIOT Laurence	20 000 €
Les précurseurs adipeux dérivés des cellules iPS humaines comme alternative à la greffe de tissu adipeux brun	6	DANI Christian	30 000 €
Validation du score KDRI: étude française multicentrique comparative de la survie à long-terme de patients transplantés rénaux	3	DANTAN Etienne	15 000 €
Impact d'un patch de cellules souches mésenchymateuses sur la régénération dans un modèle murin d'hépatectomie large	6	DAUJAT-CHAVANIEU Martine	30 000 €
Grading de l'inflammation microvasculaire au cours du rejet humoral pour le suivi du patient transplanté cardiaque: validation moléculaire et étude de reproductibilité	3	DUONG VAN HUYEN Jean-Paul	22 000 €
Apport diagnostique de l'élastographie ultrasonore pour le suivi des enfants greffés hépatiques à court et moyen terme de la greffe chez l'enfant	3	FRANCHI-ABELLA Stéphanie	15 000 €
Tolérance à l'ischémie froide prolongée de l'utérus de brebis après auto-transplantation	2	GAUTHIER Tristan	34 000 €
Interleukine-34, inducteur de tolérance et biomarqueur	5	GUILLONEAU Carole	34 000 €
Cellules Natural Killer et virus de l'hépatite E : complices ou rivaux dans la transplantation d'organes ?	5	JABRANE-FERRAT Nabila	30 000 €
Opposition au don d'organes : intérêt d'un canevas d'entretien avec les proches	1	KANDELMAN Stanislas	30 000 €
Evaluation de la fonction différentielle rénale par scanner chez les patients donneurs vivants d'organe: Etude Doviscan	2	MANDRY Damien	30 000 €
Etude de l'impact des inégalités socio-économiques dans la survie des patients transplantés pour carcinome hépatocellulaire	3	MENAHM Benjamin	20 000 €
L'angiogénine, un nouveau médiateur de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans le greffon rénal	2	PALLET Nicolas	30 000 €
« EPIPHITe », EPIgénétique et Pharmacologie des Immunosuppresseurs en Transplantation	4	PICARD Nicolas	30 000 €
Culture en masse de cellules endothéliales cornéennes de grade clinique pour la bioingénierie comme alternative à la greffe	6	THURET Gilles	30 000 €

Amiot Laurence :

Les mastocytes sont-ils impliqués via HLA-G dans la survie du greffon en transplantation hépatique

Les progrès médicaux et chirurgicaux en transplantation hépatique (TH) ont permis une réduction majeure de l'incidence du rejet aigu responsable de la perte du greffon. Toutefois, des pertes tardives de greffons hépatiques apparaissent dans 15% des cas. Elles se traduisent par des lésions d'hépatite chronique active d'évolution fibrosante ou des fibroses inexpliquées du greffon, et sont associées à des désordres immunologiques. Nous faisons l'hypothèse que les mastocytes et la sécrétion d'HLA-G pourraient être associés à cette perte de greffon hépatique. En effet, HLA-G est une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I non classique qui est connue pour ses propriétés immunomodulatrices capables d'induire un état de tolérance immune, bénéfique dans les situations de transplantation allogénique. Récemment, nous avons identifié les mastocytes comme des cellules associées à la fibrose hépatique de patients souffrant d'hépatite C chronique et comme une nouvelle source cellulaire pour la production d'HLA-G. A ce jour, des études sur la présence et le rôle des mastocytes bénéfique (immunotolérance) ou néfaste (implication dans la fibrogenèse) au cours de la TH n'ont jamais été menées chez l'Homme. Les objectifs de notre projet sont de déterminer en TH : i) si le nombre de mastocytes du greffon hépatique initial constitue un facteur prédictif de tolérance du greffon par l'hôte ; ii) si le taux plasmatique de HLA-G soluble chez le receveur à J0 de la greffe et au cours du suivi de greffe (1 mois, 3 mois) est aussi un facteur prédictif de tolérance du greffon ; iii) les mécanismes mis en jeu par l'étude d'un modèle in vitro de réaction lymphocytaire mixte en ajoutant différentes concentrations de mastocytes ou différents phénotypes de mastocytes. Les méthodes utilisées sont : i) la quantification du nombre de cellules HLA-G+ et des mastocytes (CD117+) par immunohistochimie sur la biopsie de revascularisation réalisée en per TH ; ii) la détermination du taux plasmatique de HLA-G par ELISA sur différentes périodes (per et post TH) ; iii) la mesure de la prolifération de lymphocytes T au cours d'une réaction lymphocytaire mixte en ajoutant ou non des mastocytes humains, dégranulés ou non issus de lignées (HMC1.1, Rosa). Résultats attendus: la cohorte attendue de patients suivis pour cette étude est de 100 patients transplantés hépatiques au CHU de RENNES sur 3 ans. Une corrélation sera recherchée entre le nombre de mastocytes et la perte du greffon. Le taux plasmatique d'HLA-G ainsi que son suivi évolutif pourrait permettre de dépister le rejet. Les études fonctionnelles permettront de préciser les mécanismes impliqués (contact nécessaire et voies de signalisation ou étude de la variation de cytokines induite ou non par l'adjonction de mastocyte). Ainsi, ce travail permettra de mettre en évidence un nouveau facteur prédictif de perte du greffon hépatique et de mieux comprendre le rôle du mastocyte au cours de la transplantation d'organe.

Dani Christian :

Les précurseurs adipeux dérivés des cellules iPS humaines comme alternative à la greffe de tissu adipeux brun

Introduction :

La démonstration récente que du tissu adipeux brun (BAT) est présent chez l'homme adulte a relancé l'intérêt de ce tissu pour lutter contre l'obésité et le diabète de type 2. En effet, le BAT est spécialisé dans la dépense d'énergie. La greffe de BAT a alors été proposée comme nouvelle thérapie pour lutter contre l'obésité et ses complications métaboliques associées. En accord avec cette hypothèse, des données pré cliniques ont montré que la greffe de BAT améliore les paramètres métaboliques chez des souris obèses et des souris diabétiques. Cependant, chez l'homme le BAT représente une fraction mineure du tissu adipeux et disparaît avec l'âge pour ne persister qu'en site profond. Une source cellulaire de précurseurs adipeux (PA) bruns autologues est alors nécessaire pour pallier à la rareté du BAT. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs), similaires aux cellules souches embryonnaires mais qui peuvent être générées à partir de cellules somatiques de patients, représentent une source illimitée de cellules autologues d'intérêt thérapeutique.

Nous avons récemment rapporté le potentiel des hiPSCs à générer des PAs, et avons mis au point un procédé efficace pour les isoler et les différencier en adipocytes bruns sans avoir à les modifier génétiquement. Enfin, nous avons montré que le Platelet Rich Plasma (PRP), un supplément biologique autologue qui améliore la prise de greffe, module la prolifération et la différenciation des PAs, via la voie du TGF β . Cette propriété pourrait nous permettre d'optimiser la formation d'adipocytes après transplantation.

Objectifs et résultats attendus:

Nous proposons d'évaluer le potentiel des PA bruns dérivés des iPSC humaines à former du tissu adipeux après transplantation chez la souris. Nous comparerons ce potentiel à celui de cultures primaires de PAs isolés de sites adipeux blancs et bruns humains adultes. Nous définirons les paramètres cellulaires qui optimisent la transplantation. Nous déterminerons également si la modulation de l'activité TGF β du PRP permet d'améliorer la transplantation et la survie des PAs bruns dérivés des hiPSC. Enfin, le tissu adipeux néoformé sera soumis à des variations des conditions physiologiques pour tester sa fonctionnalité. L'ensemble du projet représente une étape nécessaire au développement d'une thérapie passant par la transplantation de PAs bruns autologues dérivés de cellules hiPS de patients obèses et/ou diabétiques palliant ainsi au manque de BAT pouvant être greffé.

Méthodologie :

Les PA humains seront dérivés des iPSCs établies au laboratoire, et d'un site adipeux brun (menton) et blanc (genou) humain comme nous l'avons récemment rapporté. Le PRP de sujets sains sera préparé en utilisant le kit Regenlab. Les PAs seront ensuite transplantés en absence ou en présence de PRP et d'un inhibiteur de la voie TGF β en site sous-cutané chez la souris immunodéficiente Rag2-/- . Au préalable, les PAs auront été marqués par la GFP ou la luciférase afin de pouvoir suivre la prise de greffe et le devenir des cellules sur l'animal vivant grâce à un équipement IVIS Lumina series III. Un agoniste bêta adrénérgique, le CL316243 sera injecté dans les souris transplantées afin de tester la fonctionnalité du tissu adipeux brun formé. Enfin, les adipocytes formés seront récupérés puis la

respiration mitochondriale, signe d'adipocytes bruns fonctionnels sera analysée avec l'équipement Seahorse.

Dantan Etienne :

Validation du score KDRI: étude française multicentrique comparative de la survie à long-terme de patients transplantés rénaux

Chez les patients transplantés rénaux, prédire la survenue d'un échec de greffe est essentiel pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique adaptée. En particulier, l'étude des caractéristiques marginales du donneur et des interactions avec celles du receveur constitue une piste de réflexion vers de nouvelles sources de greffons et une optimisation des chances de survie de la greffe rénale. La marginalisation du donneur a été caractérisée en 2002 aux Etats Unis par le critère Expanded Criteria Donor (ECD), dont une revue systématique de la littérature a récemment mis en évidence l'absence de validation en France. Récemment, le Kidney Donor Risk Index (KDRI) a également été proposé aux Etats-Unis comme indicateur de la qualité d'un greffon.

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer les capacités du score KDRI à pronostiquer la survenue d'un échec de greffe à partir d'une cohorte de patients transplantés rénaux français. Si l'étude proposée ne permet pas de valider le score KDRI comme ayant de bonnes aptitudes à prédire la survenue d'un échec de greffe, il est envisagé d'élaborer un score donneur à partir des caractéristiques du donneur qui soient propres aux spécificités de la population française de patients transplantés rénaux. Par ailleurs, une étude des interactions entre les caractéristiques du receveur et le score KDRI validé ou le score donneur développé sera réalisée. Un objectif secondaire de ce projet est d'évaluer les capacités du critère ECD à pronostiquer la survenue d'un échec de greffe.

La cohorte française observationnelle DIVAT regroupe les données nécessaires à l'étude de la survie du patient transplanté rénal. Les critères d'inclusion sont les suivants : patients adultes recevant un rein seul, de donneur décédé, transplanté entre 2000 et 2014. Le critère de jugement principal est l'échec de greffe défini comme le délai de survenue d'un retour en dialyse ou d'un décès avec greffon fonctionnel. Le KDRI sera calculé selon les items proposés par l'OPTN (Organ Procurement and Transplantation Network). D'après l'UNOS (United Network for Organ Sharing), un greffon de donneur ECD est défini par un donneur en état de mort encéphalique âgé de 60 ans ou plus, ou bien âgé de 50 à 59 ans avec deux des trois critères supplémentaires tels qu'un donneur décédé d'accident vasculaire cérébral, avec des antécédents d'hypertension artérielle, ou une créatinine sérique supérieure à 1.5mg/dL. Les critères KDRI et ECD sont définis à partir de caractéristiques du donneur disponibles au sein du registre CRISTAL.

Deux analyses de survie, réalisées à partir d'un modèle de Cox multivarié, permettront de valider les indicateurs KDRI et ECD comme étant corrélés ou non à la survenue d'un échec de greffe. Complétée par une étude de leurs aptitudes pronostiques (courbe ROC associées), cette analyse pourrait confirmer l'intérêt de ces critères dans les règles d'attribution des greffons. L'étude des interactions du score KDRI avec les caractéristiques marginales du receveur pourrait permettre l'identification de receveurs pour lesquelles l'attribution de greffons issus de donneurs marginaux ne constitue pas une perte de chance de survie de greffe rénale. Par exemple, les greffons avec un KDRI élevé semblant avoir des survies inférieures à ceux ayant un KDRI faibles, cela pourrait justifier leur attribution

prioritaire à des receveurs âgés ; la question de l'identification d'un seuil de discrimination du score KDRI ainsi que celle du critère d'âge du receveur se pose alors.

Daujat-Chavanieu Martine :

Impact d'un patch de cellules souches mésenchymateuses sur la régénération dans un modèle murin d'hépatectomie large

L'insuffisance hépatocellulaire post-chirurgie de résection hépatique reste la principale cause de mortalité postopératoire. La médecine régénératrice avec les cellules souches est une thérapie prometteuse pour les traiter. Plusieurs sources cellulaires ont été étudiées, telles que les hépatocytes, les progéniteurs hépatiques et plus récemment les cellules souches mésenchymateuses (MSC) grâce à leurs propriétés prolifératives, anti-inflammatoires et pro-angiogéniques. Ces dernières pourraient migrer de la moelle osseuse vers le foie lésé et contribuer à sa régénération par l'intermédiaire de cytokines, facteurs de croissance et possiblement de microvésicules et transfert de matériel cellulaire. Lors des protocoles de biothérapie, les MSC sont généralement injectées par voie systémique périphérique, intraportale ou en intrapéritonéal. Ces voies présentent plusieurs inconvénients, notamment des risques d'embolie et une rétention des cellules dans le système pulmonaire.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'impact des MSC sur la régénération hépatique après une hépatectomie large chez la souris. L'aspect novateur du protocole est d'implanter des MSC allogènes en contact direct avec le foie restant dans le but de favoriser l'effet paracrine. Les cellules seront immobilisées sur une membrane amniotique humaine dé-épithélialisée qui sera appliquée comme un patch sur le foie résiduel. Des résultats préliminaires indiquent que les MSC cultivées sur la membrane amniotique prolifèrent et conservent leur capacité de différenciation caractéristique. Le modèle d'hépatectomie est d'ores et déjà mis en place. La résection de 80% du foie entraîne une insuffisance hépatocellulaire provoquant le décès dans les 48h dans 75% des cas. Les résultats attendus après application du patch sont une meilleure survie des animaux, une augmentation de la régénération et une amélioration rapide de la fonction hépatique, en comparaison à un traitement classique par injection des MSC. L'effet propre de la membrane amniotique sur ces paramètres sera également évalué, ce qui n'a jamais été réalisé.

Duong Van Huyen Jean-Paul :

Grading de l'inflammation microvasculaire au cours du rejet humoral pour le suivi du patient transplanté cardiaque: validation moléculaire et étude de reproductibilité

Etat de l'art

Le rejet d'allogreffe médié par les anticorps (AMR), dont une des lésions caractéristiques est l'inflammation microvasculaire, présente des difficultés diagnostiques. Des travaux récents ont suggéré que la confrontation d'une analyse moléculaire du greffon rénal et de l'histologie conventionnelle permettait une amélioration du diagnostic.

Objectifs

Notre objectif est donc:

- de scorer de manière semi-quantitative l'inflammation microvasculaire (score IAMC) dans les biopsies endomyocardiques (BEM),
- de comparer ce score aux lésions qui constituent le "gold standard" actuel en pathologie de la transplantation cardiaque,
- de comparer ce score aux profils d'expression de gènes reflétant le rejet médié par les anticorps (Pathogenesis Based Transcripts ou PBTs) dans les biopsies scorées
- de déterminer la reproductibilité du score en multi-centrique

Méthodologie et résultats préliminaires

Les lames d'histologie, les BEM congelées et les données médicales de 80 patients transplantés cardiaques présentant un diagnostic d'AMR basé sur la classification de consensus 2013 de l'ISHLT International Society for Heart and Lung Transplantation, ou ne présentant pas d'AMR (groupe contrôle) seront collectées de manière rétrospective dans les centres participants.

Les lames virtuelles de ces BEM seront centralisées sur un serveur pour une relecture via le web par les différents pathologistes impliqués et un score IAMC leur sera attribué.

Le score IAMC sera comparé aux PBTs et aux lésions standards de rejet selon la classification ISHLT. En parallèle la reproductibilité du score sera évaluée sur une cohorte test et une cohorte de validation.

Nos résultats préliminaires suggèrent que les PBTs sont exprimés de manière incrémentale lors de l'augmentation du score. L'expression de gènes reflétant le rejet médié par les anticorps serait donc associée au score IAMC, suggérant que le score IAMC pourrait être un outil de valeur pour diagnostiquer l'AMR de manière plus fine.

Résultats attendus

Nous nous attendons, au vu des résultats préliminaires, à ce que l'augmentation de l'inflammation microvasculaire reflétée par le score IAMC soit appuyée par les données d'expression génique dans les BEM. L'évaluation du score par des pathologistes expérimentés ne présente pas de difficulté particulière.

Ce score représente un outil nécessaire et attendu par la communauté des pathologistes et pourra contribuer à l'amélioration du diagnostic et au suivi du patient en transplantation cardiaque.

Franchi-Abella Stéphanie :

Apport diagnostique de l'élastographie ultrasonore pour le suivi des enfants greffés hépatiques à court et moyen terme de la greffe chez l'enfant

Objectifs :

Décrire l'évolution de la dureté du foie et de la rate mesurée par élastographie Supersonic shear Wave Elastography (SSWE) à court et moyen terme après greffe hépatique pédiatrique et d'évaluer leurs performances diagnostiques pour le diagnostic des complications au décours de la greffe

Résultats attendus :

En l'absence de complication la dureté du greffon hépatique est élevée dans la période post-opératoire immédiate puis décroît pour atteindre des valeurs proches de la normale entre la deuxième et la troisième semaine après la greffe. La dureté de la rate diminuera progressivement au décours de la greffe avec une distinction entre les patients avec hypertension portale pré-greffe dont les rates ont une dureté élevée et les patients sans hypertension portale ont une rate de dureté normale qui pourra s'élever un peu en post-greffe en raison de l'augmentation de la dureté du greffon hépatique.

En cas d'atteinte intra-hépatique à type de rejet, de stase veineuse ou de stase biliaire, les valeurs de dureté du greffon et de la rate resteront élevées ou s'élèveront en cas de baisse initiale. En cas de bloc pré-hépatique isolé (par exemple sténose ou thrombose porte) les chiffres de dureté du greffon hépatique seront conformes à la valeur attendue par rapport au délai post-greffe alors que la dureté de la rate aura augmenté ou au moins stagné à des valeurs élevées par rapport aux valeurs pré-greffe.

La cinétique d'évolution des valeurs de dureté du greffon hépatique et de la rate sera probablement d'un apport significatif pour le dépistage et le diagnostic de complication post-greffe et pourrait permettre en fonction du profil présenté d'augmenter la confiance diagnostique et de proposer des algorithmes décisionnels permettant de hiérarchiser les examens complémentaires nécessaires à la confirmation du diagnostic ; suivant le cas biopsie hépatique, angioscanner, cholangiographie, angiographie...

Méthodologie :

Il s'agit d'une étude prospective observationnelle de soin courant monocentrique.

Des mesures de dureté du foie et de la rate seront réalisées en utilisant la technique SSWE disponible sur un échographe de routine clinique (Aixplorer, SupersonicImagie France). Ces mesures seront réalisées dans le cadre du soin habituel lors de l'écho-Doppler abdominal systématique lors des six premiers mois post-greffe. La durée de ces mesures ne prolongera pas l'examen de plus de 5 minutes. Les résultats de l'élastographie SSWE ne modifieront pas la prise en charge de l'enfant, celle-ci restant conforme à la prise en charge dans le cadre du soin habituel. Cette recherche n'induit aucun risque supplémentaire.

Seront décrites les cinétiques d'évolution des duretés du greffon hépatique et de la rate ainsi que le ratio entre dureté de la rate pré-opératoire et post-opératoire. Seront calculées les performances pour le diagnostic des complications en fonction du type de complication avec l'utilisation de courbes AUROC. Enfin on proposera des algorithmes décisionnels en fonction des éléments cliniques, biologiques et des valeurs de dureté du foie et de la rate.

Tristan Gauthier :

Tolérance à l'ischémie froide prolongée de l'utérus de brebis après auto-transplantation

En 2014 a eu lieu la première naissance après greffe utérine en Suède avec donneuse vivante. Ce type de don pose un certains nombres de question éthique. L'utilisation de donneuses en état de mort encéphalique aurait l'avantage notamment de ne pas entrainer de risques chirurgicaux chez la donneuse dans le cadre d'un don d'organe non vital. Cependant il existe peu de données sur la tolérance à l'ischémie froide prolongée de l'utérus chez le gros animal ou chez l'humain. Par ailleurs, il n'y a pas de solution de préservation de référence dans le cadre du prélèvement utérin.

A partir du modèle chirurgical standardisé d'auto-transplantation utilisé lors de nos récentes expérimentations chez la brebis nous proposons de comparer l'utilisation de deux solutions de conservation (CELSIOR® et HTK custodiol®) pour la conservation de l'utérus en phase d'ischémie froide prolongée.

Nous avons choisi d'utiliser le CELSIOR® car il s'agit d'un liquide de conservation largement utilisé en transplantation cardiaque, rénale et pancréatique et lors de nos précédentes études. La solution HTK custodiol® quant à elle a été utilisée lors de la réalisation des greffes utérines ayant entrainé les premières naissances en Suède.

Objectif principal:

Evaluer la viabilité macroscopique de l'utérus de brebis après 24h d'ischémie froide et auto-transplantation en fonction du type de solution de préservation utilisée (CELSIOR® et HTK custodiol®). Notre critère de jugement principal sera la présence de contractions utérine à la stimulation lors d'une évaluation chirurgicale à distance de l'auto-transplantation.

Objectifs secondaires :

Evaluer la tolérance de l'utérus à l'ischémie froide sur le plan anatomopathologique, immunohistochimique et biochimique. Evaluer également les possibilités de grossesse après transfert de blastocystes 24 heures d'ischémie froide et auto-transplantation.

Comme critères de jugements secondaires nous étudierons les valeurs du pH et des lactates veineux, la recherche de marquage apoptotique par TUNEL et Caspase 3, d'œdème et de nécrose par analyse anatomopathologique et l'analyse de différents marqueurs du stress oxydatif. Concernant l'évaluation de la procréation nous étudierons le taux de grossesse et de naissance après transfert de blastocystes congelés.

Résultats attendus:

Nous espérons, grâce à cette étude, définir quel est le milieu de conservation le plus adapté en cas de transplantation utérine et obtenir les premières grossesses après ischémie froide prolongée de 24 heures de l'utérus chez le gros animal.

Méthodologie:

Nous prévoyons de réaliser 20 auto-transplantations utérines chez la brebis après 24 heures d'ischémie froide et conservation de l'utérus au sein du Celsior® ou de l'HTK® dans le laboratoire agréé animalier d'analyse et de recherche de Haute-Vienne. Le type de solution sera randomisé avant la procédure chirurgicale. Nous étudierons la viabilité de l'utérus de manière macroscopique immédiatement après reperfusion, jusqu' 2 heures post reperfusion et à 8 jours de l'auto-transplantation.

Nous réaliserons parallèlement à ces différents temps des biopsies utérines et des prélèvements veineux utérins afin d'évaluer l'acidose, la nécrose, l'apoptose et le stress oxydatif du greffon post reperfusion.

En cas d'utérus macroscopiquement viable (contraction et absence de nécrose à J8), nous envisagerons un transfert de blastocystes congelés après synchronisation de la brebis afin de tenter d'obtenir des grossesses.

Guillonneau Carole :

Interleukine-34, inducteur de tolérance et biomarqueur

Le développement de nouveaux traitements plus spécifiques en transplantation afin d'induire moins d'effets secondaires et une tolérance est un objectif majeur. Récemment, nous avons pu montrer le potentiel d'une thérapie cellulaire avec des Tregs CD8+CD45RClow dans un modèle de souris humanisées inhibant la GVH ou le rejet de greffe de peau humaine. Chez le rat, nous avons montré que les Treg CD8+CD45RClow utilisent l'interleukine-34 (IL-34) comme inducteur de tolérance et que l'injection d'un AAV-IL-34 induit une tolérance à l'allogreffe. Chez l'Homme, nos résultats indiquent une expression spécifique d'IL-34 par les Tregs CD4+ et CD8+ CD45RClowFoxp3+ (Bézie et al., J.Clin. Invest., 2015).

L'objectif de ce projet est d'identifier le rôle de l'IL-34 chez l'homme comme inducteur de tolérance et potentiel biomarqueur d'évolution de la transplantation et du patient.

1) Détermination du rôle d'IL-34 chez l'Homme. Nous analyserons les mécanismes d'action d'IL34 humaine sur les différentes sous-populations cellulaires in vitro et son effet sur la différenciation/génération de Tregs.

2) Etude de l'expression d'IL34 chez des volontaires sains vs patients transplantés : marqueur d'évolution des greffons. Nous étudierons une cohorte de patients transplantés rénaux (DIVAT) et moelle osseuse (BIOCORD) avec différentes évolutions. Nous allons comparer l'expression de l'IL-34 et la co-expression d'autres marqueurs et la capacité suppressive des cellules exprimant l'IL-34 dans les différents groupes de patients.

3) Evaluation préclinique du potentiel de l'IL-34. Nous analyserons in vivo le potentiel d'IL34 recombinantes soluble humaine ou des cellules différenciées in vitro par l'IL34 dans l'inhibition du rejet de greffe de peau humaine ou de la GVH chez la souris humanisées.

Ce projet permettra de décrire le rôle d'une nouvelle cytokine en transplantation humaine en tant que nouvelle stratégie d'induction de tolérance et biomarqueur des patients avant et après transplantation.

Jabrane-Ferrat Nabila :

Cellules Natural Killer et virus de l'hépatite E : complices ou rivaux dans la transplantation d'organes ?

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un petit virus à ARN simple brin de polarité positive. L'infection par VHE de génotype 3 est généralement résolutive chez le sujet immunocompétent mais peut être responsable d'hépatites chroniques chez les patients immunodéprimés.

Les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules de l'immunité innée capables de reconnaître des cellules infectées par des virus et de les éliminer. Les cellules NK interagissent avec différents acteurs de l'immunité tels que les cellules dendritiques afin d'amplifier la réponse immune sur le site de l'infection. Enfin, ces cellules sont capables de contrôler la réponse immunitaire adaptative.

Notre hypothèse est que des dérèglements de la fonction des cellules NK au cours de l'infection VHE chez des sujets transplantés d'organes sont à l'origine de l'évolution vers une infection chronique.

Notre projet se décline ainsi en 3 objectifs principaux i) caractérisation phénotypique des cellules immunitaires lors de l'infection VHE, ii) compréhension de l'impact de l'infection sur les fonctions effectrices des cellules NK et définition de la place de ces cellules dans la modulation de la réponse immune globale, iii) identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la réponse des cellules NK au cours de l'infection: rôle des variants des NCR et des miARN. L'identification d'une signature cellulaire et moléculaire qui régule les fonctions des cellules NK nous aidera à mieux caractériser la pathogenèse du VHE dans le cadre de la transplantation d'organe et pourrait ouvrir des perspectives quant à une modulation pharmacologique au bénéfice des patients.

Kandelman Stanislas :

Opposition au don d'organes : intérêt d'un canevas d'entretien avec les proches

Contexte : En France, le principal motif de non de prélèvement chez un sujet en état de mort encéphalique susceptible de faire don de ses organes est l'opposition exprimée par les proches. Lorsque cette opposition est le simple relais de la position du défunt, l'arrêt de toute procédure respecte les lois de bioéthique encadrant cette situation. En revanche, bien souvent, la position du défunt n'est pas connue des proches et le refus exprimé est alors le fait d'une opposition de leur part.

Dans cette situation, de nombreux facteurs peuvent être associés à un refus exprimé par les proches. Parmi ceux-ci, des facteurs liés à l'entretien avec les proches ont été mis en évidence. Cependant, il existe peu de données françaises.

Objectif et résultats attendus : Nous avons émis l'hypothèse que pour les situations de sujets en état de mort encéphalique, un outil d'aide à l'entretien destiné aux médecins et infirmiers de coordination, sous forme d'un canevas d'entretien, permettrait une réduction du taux d'opposition au don d'organes de 45% (taux d'opposition du Réseau nord francilien en 2014) à 30% (en deçà des données nationales).

Méthodologie : étude d'évaluation des pratiques, observationnelle, multicentrique, à trois phases d'intérêt, portant sur les entretiens réalisés chez les proches de sujets en état de mort encéphalique. Une première période de deux ans de juillet 2012 à juin 2014 (phase « avant »), constituera la période de référence. Une deuxième période, correspondant à la mise en place de l'étude, comportera une phase de présentation du canevas à l'ensemble des professionnels de groupe d'étude (Réseau nord francilien) susceptibles de réaliser des entretiens avec les proches de sujets en état de mort encéphalique ainsi qu'une phase d'appropriation de l'outil d'une durée de 3 à 6 mois. A son issue débutera la troisième période (phase « après »), d'une durée de 24 mois. Critère principal de jugement : taux d'opposition au don ; Critère secondaire de jugement : taux d'adhésion au canevas par les professionnels. La différence « avant-après » du taux d'opposition sera comparée entre le réseau Nord Francilien et reste du territoire national (groupe contrôle). Le nombre d'entretiens à réaliser pour démontrer avec une puissance de 80% une diminution du taux d'opposition sur le Réseau nord francilien de 45% à 30% est de 180. Un recueil de critères visant à évaluer l'adhésion au canevas par les médecins réanimateurs et les infirmier(e)s de coordination sera réalisé à l'issue de chaque entretien pendant la phase « après ».

Mandry Damien :

Evaluation de la fonction différentielle rénale par scanner chez les patients donneurs vivants
d'organe: Etude Doviscan

Le développement de la greffe rénale à partir de donneur vivant est l'une des priorités du plan greffe 2012-2016. Dans le cadre du bilan initialement réalisé chez le donneur vivant, l'imagerie a un double rôle : morphologique vasculaire et parenchymateux, et fonctionnel pour calculer la fonction rénale différentielle (FRD) c'est-à-dire la part respective des 2 reins dans la fonction rénale qui est actuellement évaluée par la scintigraphie au MAG3.

L'introduction récente de nouveaux scanners RX, permettant de couvrir les deux reins en une simple rotation, pour une dose délivrée très réduite, relance l'intérêt de la scanographie pour mesurer la FRD, en complément et dans le même temps que le bilan de cartographie vasculaire et la mesure du volume parenchymateux habituellement réalisés. Par rapport à la scintigraphie, la dose délivrée au patient sur un scanographe récent est très modérément augmentée au niveau des aires rénales, mais il existe une quasi élimination à distance et notamment au niveau des organes à risque (gonades, cerveau, cristallin).

L'étude proposée est comparative, transversale, monocentrique, avec explorations par scanner avec injection de produit de contraste et scintigraphie rénale, sur sujets appariés.

Son objectif principal est d'évaluer le degré de concordance entre la FRD mesurée par scanographie, et celle mesurée par scintigraphie rénale, dans l'évaluation de la fonction rénale chez les patients donneurs vivants en vue d'un possible don de rein.

Ses objectifs secondaires sont d'évaluer:

1. La reproductibilité intra et inter-opérateur dans le traitement des données pour la scanographie.
2. La dose RX délivrée au patient par scanner, en comparaison de celle délivrée par la scintigraphie rénale.
3. La concordance de la scanographie selon la méthode de l'Aire sous la Courbe, de Patlak- Ruthland modifiée en comparaison avec la méthode de Patlak-Ruthland originelle.

Les résultats attendus sont, en cas de bon niveau de concordance entre scanographie et scintigraphie MAG3, la possibilité de disposer, à partir d'un unique examen scanographique, à la fois des données morphologiques classiques (cartographie vasculaire, qualité et volume du parenchyme), et de l'estimation de la FRD. Il en résulterait alors la possibilité de ne plus pratiquer de scintigraphie d'où un gain de temps pour le patient, et un coût moindre du bilan initial.

L'étude prévoit d'inclure 51 patients sur 18 mois sur le CHU de Nancy. Elle associe les services de néphrologie et d'urologie, ceux d'imagerie radiologique et nucléaire, ainsi que le CIC de Nancy par deux de ses composantes : le CIC-EC pour la méthodologie statistique et le CIC-IT pour l'archivage et l'exploitation des données scanographiques.

Ménaheem Benjamin :

Etude de l'impact des inégalités socio-économiques dans la survie des patients transplantés pour carcinome hépatocellulaire

Objectif :

Déterminer à partir d'un modèle multi-niveaux utilisant l'index de déprivation européen, l'impact des inégalités sociales sur la survie après transplantation hépatique (TH) pour carcinome hépatocellulaire.

Résultats attendus :

Les patients avec un index de déprivation plus élevé, donc issus de milieux plus défavorisés, ont une moins bonne survie à long terme après transplantation hépatique pour carcinome hépatocellulaire.

Méthodologie :

Création de l'EDI :

Etudier à l'échelle individuelle les inégalités socio-économiques présente plusieurs difficultés en particulier de non disponibilité des données. C'est pour cette raison que notre équipe a développé un indice agrégé de défavorisation (l'EDI) déclinable à l'échelle européenne. Ainsi, le géocodage réalisé à partir de l'adresse des patients permet de localiser le patient dans un IRIS (îlots regroupé pour l'information statistique de l'INSEE). L'EDI est ensuite attribué en fonction de l'IRIS auquel appartient le patient. Ainsi, 5 niveaux d'inégalités socio-économiques sont élaborés et seront ensuite étudiés et intégrés dans l'élaboration du modèle multi-niveaux.

Intérêt du modèle multi-niveaux :

Les modèle multi-niveaux se sont développés car ils permettent la prise en compte d'une structuration hiérarchique des données permettant d'estimer d'une part l'effet de variable explicative individuelle ainsi que la mise en évidence d'un facteur extrinsèque environnemental comme peuvent l'être les inégalités socio-économiques (ISE).

Etude de survie :

Une étude de survie brute sera élaborée à partir des facteurs pronostiques intrinsèques connus de la transplantation hépatique (état physique du receveur, indication de la TH, caractéristiques du greffon) en ajoutant les facteurs extrinsèques (ISE). Puis, il sera réalisé une étude de survie nette afin de déterminer le rôle des différents facteurs sur la survie après TH pour carcinome hépatocellulaire.

Pallet Nicolas :

L'angiogénine, un nouveau médiateur de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans le greffon rénal

Contexte :

La perte progressive de fonction des greffons rénaux est associée à des lésions histologiques chroniques d'atrophie tubulaire, de fibrose interstitielle, d'artériosclérose et de glomérulosclérose. Les lésions rénales aiguës (AKI, acute kidney injury) survenant notamment à l'issue du processus d'ischémie-reperfusion (IR) contribue au développement de ces lésions chroniques. A l'échelon cellulaire, l'AKI s'accompagne de modifications micro-environnementales qui imposent aux cellules d'activer des réponses biologiques adaptatives au stress ayant comme objet de reprogrammer leur métabolisme et de produire des signaux d'alarme qui participent au remodelage tissulaire en induisant de l'inflammation et la fibrogénèse. De nombreux stress tissulaires et cellulaires, dont l'ischémie, le stress oxydatif, la néphrotoxicité, ou la protéinurie induisent un stress du Réticulum Endoplasmique (RE), qui, dans le rein, participe à l'AKI et contribue au développement de lésions chroniques. L'Angiogénine (ANG) est une ribonucléase sécrétée qui clive les ARN de transfert en fragments appelés tRNA qui réduisent la synthèse protéique lors d'un stress cellulaire. L'ANG est également libérée dans le milieu extracellulaire, mais ses fonctions paracrines sont peu connues. Il n'existe actuellement aucune donnée concernant l'implication de l'ANG dans la réponse au stress du RE rénal et dans le développement des lésions chroniques consécutives à une AKI.

Objectifs :

L'objectif général de notre travail est d'intégrer les voies de signalisation de l'ANG dans la réponse cellulaire au stress du RE dans le rein. Nous avons récemment montré que l'ANG était un régulateur important de la réponse tissulaire rénale à l'AKI induite par le stress du RE ; que l'ANG sécrétée avait des propriétés similaires aux alarmines en activant les macrophages (M ϕ) ; et qu'enfin, l'ANG urinaire pouvait servir de marqueur non invasif de lésions tubulaires rénales.

Néanmoins, de nombreuses questions demeurent, et les objectifs de ce projet de recherche sont :

- (1) de déterminer la contribution de l'ANG dans le développement de lésions histologiques chroniques consécutives à l'AKI,
- (2) de déterminer les mécanismes par lesquels l'ANG active les M ϕ , et comment cela impacte le développement de lésions tissulaires chroniques,
- (3), de déterminer les propriétés diagnostiques et pronostiques de l'ANG urinaire en transplantation rénale.

Méthodologie :

Notre projet combine des modèles in vitro et in vivo avec l'analyse de données issues de cohortes de patients transplantés rénaux afin de caractériser les bases moléculaires de la contribution de l'ANG dans les effets du stress du RE dans le rein. Des M ϕ humains en culture seront utilisés pour déterminer les mécanismes activateurs de l'ANG. Des modèles murins d'AKI associée au stress du RE (IR, injection de tunycamycine et néphrotoxicité de la cyclosporine) utilisant des souris génétiquement modifiées (souris invalidées constitutivement pour l'ANG, et souris Ksp1.3.rtTA;tetO.Cre;Ang/Angm, dont la sécrétion tubulaire d'ANG est inhibée de manière inductible) seront analysés. Enfin, nous allons mesurer les concentration urinaires d'ANG dans deux

cohortes de patients transplantés rénaux afin de déterminer les valeurs diagnostiques et pronostiques d'ANG urinaire à la suite d'une AKI.

Résultats attendus :

Nous allons montrer que l'ANG est un nouveau médiateur de la réponse au stress du RE dans le rein contribuant au développement des lésions histologiques chroniques consécutives à l'AKI et l'IR. Ce projet pourra générer des nouveaux outils diagnostiques et pronostiques à même d'améliorer la prise en charge des patients transplantés rénaux.

Picard Nicolas :

« EPIPHITe », EPIgénétique et Pharmacologie des Immunosuppresseurs en Transplantation

La variabilité génétique explique une partie des différences de réponse observées suite à l'administration d'une même dose de médicament à deux individus distincts. Dans le domaine de la greffe, le génotypage des cytochromes P450 (CYP) 3A5 et 3A4 est ainsi proposé pour affiner le choix posologique initial du tacrolimus (Prograf® ou Advagraf® ; 1720 analyses du CYP3A5 en 2014 selon le rapport médical et scientifique de l'Agence de la Biomédecine). Ce type d'exploration génétique a cependant un bénéfice restreint. Tout d'abord elle n'explique qu'une partie de la variabilité observée. Ainsi, en greffe rénale, le génotypage CYP3A5 est prédictif de la biodisponibilité du tacrolimus mais pas du risque de rejet aigu ou de l'évolution de la fonction rénale. Par ailleurs, ces variations génétiques, stables, ne permettent pas d'anticiper la variabilité intra-individuelle (évolution de la tolérance ou de l'efficacité du traitement). Les modifications épigénétiques sont dynamiques et réversibles. Elles influencent l'expression des gènes sans induire de modification de la séquence d'ADN (méthylation de l'ADN, modifications post traductionnelles des histones, effets d'ARN non codants). Plusieurs études récentes suggèrent que ces modifications jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression de pharmacogènes (CYP, transporteurs membranaires, etc). Des modifications épigénétiques peuvent par ailleurs être induites ou reversées par certains médicaments. Ce nouveau champ de recherche (la « pharmacoépigénétique ») ne pourra pas s'appliquer à l'ensemble des domaines thérapeutiques : les régulations épigénétiques interviennent en effet avec une importante spécificité tissulaire. Par conséquent, envisager l'étude clinique ou l'utilisation de biomarqueurs épigénétiques impliquent d'avoir accès au tissu concerné. C'est le cas en greffe où les cellules immunitaires, cibles du traitement, sont accessibles par simple prise de sang périphérique. Le projet « EPIPHITe » vise à caractériser, in vivo, chez l'animal, les modifications épigénétiques induites par l'exposition chronique aux immunosuppresseurs de la famille des inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus). Des souris C57BL/6J ont été exposées à ces médicaments (ou à une solution contrôle) pendant une durée allant de 1 à 83 jours. Leur lymphocytes T CD4+ ainsi qu'un lobe hépatique et un rein ont été isolés et cryoconservés. La présente demande de subvention vise à financer les analyses épigénétiques des échantillons recueillis. Après extraction et immunoprécipitation de l'ADN méthylés des LT CD4+, du foie et d'urine, les profils de méthylation des souris exposées et non exposées seront étudiés par séquençage haut débit de nouvelle génération (MeDIP-seq). Les ARNm rénaux, hépatiques et ceux des LT CD4 seront analysés par séquençage transcriptomique complet (RNA-Seq). La faisabilité du projet a été vérifiée dans le cadre d'une étude préliminaire financée par un appel d'offre régional en 2014.

Thuret Gilles :

Culture en masse de cellules endothéliales cornéennes de grade clinique pour la bioingénierie comme alternative à la greffe

Le déséquilibre mondial entre besoin en greffe et don de cornée est majeur (ratio 70/1). Un tiers des greffes est réalisé pour des pathologies endothéliales. Le bioengineering endothélial, aujourd'hui considéré comme la solution la plus réaliste pour remplacer ces greffes, se décline en 2 modes : 1/ injection directe en chambre antérieure de cellules endothéliales cornéennes (CECs) cultivées ; 2/reconstruction in vitro de greffons par endothélialisation d'un fin support transparent. Ces 2 procédés requièrent une production en masse de CECs de grade clinique. Il n'existait pas jusqu'à présent de procédé efficace : la différenciation de cellules souches est encore expérimentale et les cultures primaires rapportées récemment par les Japonais ne sont pas transposables en Europe (nécessitent des donneurs de moins de 30 ans exceptionnels en Europe et l'usage de molécules indisponibles en clinique (Rock-Inhibiteur, inhibiteur de TGF-B, surnageant d'autres cellules)).

Notre laboratoire BiiGC a mis au point en 2014 un process de culture à partir des donneurs d'âge habituel en Europe (70 ans), sans produit animal et uniquement à partir de molécules utilisables chez l'homme. Nous obtenons ainsi en 6 semaines 300 millions de CECs à partir d'une seule cornée (de quoi traiter théoriquement 300 patients...) mais ce process n'est efficace à l'heure actuelle que pour ¼ des donneurs.

Objectifs :

- Optimiser notre process en identifiant en particulier les caractéristiques des donneurs influençant son succès
- Analyser, grâce à notre bioréacteur original la fonctionnalité des CECs obtenues c'est-à-dire leur capacité à assurer la transparence cornéenne et déterminer le nombre de cellules à injecter
- Transposer le process aux normes GMP afin de le transférer vers une unité de production de grade clinique pour préparer la « first in man study ».

Résultats attendus :

Process de production en masse de cellules endothéliales cornéennes prêtes à être testées en clinique.

Méthodologie et moyens :

- An 1 : optimisation du process de culture. Caractérisation des CECs par immunomarquage et RT-PCR (BiiGC + EFS St-Etienne)
- An 2 : tests en bioréacteur avec ré-endothélialisation de cornée dépourvue d'endothélium ; détermination du nombre de CECs à injecter ; analyse de la fonctionnalité du néo-endothélium (capacité de déturgescence sans et avec inhibiteur des pompes Na/K; immunomarquage/histologie et MET/MEB (BiiGC)
- An 3 : préparation de la production aux normes GMP. Analyse de risque général du procédé, choix des réactifs et consommables de culture, identification des contrôles qualité à mettre en place pour les matières premières, produits intermédiaires et produits finis (identité, pureté, sécurité, fonctionnalité) et choix des spécifications (BiiGC + EFS Grenoble).

BiiGC dispose d'un plateau complet de culture (salle blanche en surpression), de caractérisation cellulaire (plateforme de microscopie dont confocal) et d'un bioréacteur cornéen breveté inédit couplé à de l'imagerie cornéenne dédiée.