

**Résumés des projets de recherche financés dans le cadre de l'appel d'offres
2015 « Recherche et greffe »**

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
AUGE Nathalie	<u>Jonctions communicantes et connexines, nouvelles cibles de l'immunité humorale dans la vasculopathie de transplantation</u>	10 000 €
BACCHETTA Justine	<u>Suivi de la microarchitecture osseuse par tomographie périphérique quantitative de haute résolution chez le patient transplanté</u>	15 000 €
CANQUE Bruno	<u>Cartographie développementale du système immunitaire humain : implications pour la prise en charge des patients allogreffés</u>	30 000 €
CHARREAU Béatrice	<u>Définition et contrôle de l'inflammation microvasculaire au cours du rejet aigu tumoral en transplantation cardiaque : nouvelles cibles cellulaires et moléculaires</u>	20 000 €
CHATELET Valérie LOBBEDEZ Thierry	<u>La précarité, estimée par l'European Deprivation Index, est-elle associée à l'échec de transplantation rénale?</u>	20 000 €
CHIFFOLEAU Elise	<u>Déterminer le rôle de CLEC-1 dans les cellules dendritiques humaines et la polarisation des LT CD4+ Th17</u>	30 000 €
COMPAGNON Philippe	<u>La machine de perfusion transportable Aidrive®, une nouvelle approche pour augmenter en toute sécurité le pool de donneur et optimiser l'organisation logistique de la transplantation hépatique</u>	20 000 €
CONTI Filomena	<u>Evaluation de la prévalence et de la réponse à la vaccination avant transplantation hépatique</u>	15 000 €
D'AVENI Maud	<u>Ingénierie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton dans la réaction du greffon contre l'hôte</u>	20 000 €
DUCLOS-VALLEE Jean-Charles	<u>Microbiote et tolérance en transplantation hépatique : application au modèle du rejet aigu</u>	10 000 €
FILATRE Pierre	<u>Oxygénation par membrane extracorporelle et le suivi des médicaments de l'infection - ECMOTION (Extracorporeal membrane oxygenation and therapeutic drug monitoring of drugs of infection - ecmotion)</u>	20 000 €
GEORGET Gilles	<u>Lever les freins professionnels au prélèvement de cornées par la communication engageante</u>	20 000 €
GUILLONNEAU Carole	<u>Nouvelle immunothérapie tolérogène dans le traitement du rejet de greffe de cœur et la GVHD aigüe</u>	15 000 €
IVANOVIC Zoran	<u>Réalisation des greffons hématopoïétiques à partir de cellules CD34+ récupérées par cytophérèse sans mobilisation et amplifiées ex vivo</u>	20 000 €
LAUNAY David	<u>Identification de cibles antigéniques spécifiques de la maladie du greffon contre l'hôte chronique sclérodermique comparé à la sclérodémie systémique par une approche immunoprotéomique bidimensionnelle en fluorescence</u>	15 000 €
ORTONNE Nicolas	<u>Caractérisation des effecteurs cytotoxiques et des mécanismes de mort cellulaire au cours du rejet de transplantation de face</u>	15 000 €
ROBIN Marie	<u>Impact du ruxolitinib sur les profils immunitaires et hématologiques pré-allogreffe de moelle et post allogreffe de moelle chez les patients atteints de myélofibrose</u>	30 000 €
SAVIER Eric	<u>Survie des greffons et des patients après conservation parmi 5 solutions en transplantation hépatique</u>	5 000 €
TABURET Anne-Marie	<u>Nouveaux antiviraux à action directe : pharmacocinétique et interactions avec les immunosuppresseurs (cohorte ANRSCO23-CUPILT)</u>	10 000 €

Chercheur	Sujet de recherche	Subvention allouée
TAUPIN Jean-Luc	Anticorps anti-HLA de classe II spécifiques du donneur d'organe : détection et rôle pathogène de HLA-DQ	20 000 €
THAUNAT Olivier	Prédiction du risque de rejet humoral en monitorant les lymphocytes T helper folliculaires circulants chez les transplantés rénaux	20 000 €
VILQUIN Jean-Thomas	Thérapie cellulaire cardiaque : capacités cardiogéniques de cellules progénitrices exprimant l'Aldéhyde Déhydrogénase	20 000 €

AUGE Nathalie : Jonctions communicantes et connexines, nouvelles cibles de l'immunité humorale dans la vasculopathie de transplantation

Rationnel

La vasculopathie de transplantation (VT) est la première cause de décès à long terme des patients transplantés. Cette pathologie se caractérise par le développement d'une hyperplasie intimale dans le vaisseau du greffon, dû à la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) d'où un épaississement néo-intimal concentrique, conduisant à une ischémie et à la perte fonctionnelle de l'organe greffé. La réponse immunitaire humorale (anticorps anti-HLA), joue un rôle dans la prolifération des CML, cependant les mécanismes impliqués dans ces événements sont mal identifiés. Nos travaux récents ont mis en évidence une implication de la voie des sphingolipides (sphingomyélinase neutre de type 2, nSMase2, et sphingosine 1-phosphate, S1P), dans le développement de la VT. La régulation de cette voie par les anticorps anti-HLA n'est pas connue.

Objectif

Notre objectif est d'étudier le rôle des jonctions communicantes (jonction-gap) sur le développement de la VT, et les liens avec les sphingolipides. Les jonctions-gap et surtout la connexine 43 (Cx43) pourraient par ailleurs intervenir dans les communications entre cellules endothéliales (CE) et CML, qui contribuent à la VT.

Déroulement du projet et Résultats attendus

Nous étudierons l'expression de Cx43 dans les CML et les CE humaines, et son activation par W6/32. Les liens de Cx43 avec la voie des sphingolipides, (nSMase2, S1P) seront étudiés, tels que l'implication de nSMase2 et/ou S1P dans l'activation de Cx43, ou à l'inverse, l'effet d'inhibiteurs de Cx43 sur l'activation de nSMase2, la génération de S1P, la prolifération cellulaire, la transmission de signaux mitogènes, les interrelations CE/CML. Les résultats préliminaires montrent une implication de Cx43 en amont de nSMase2 et de la S1P.

Méthodologie

Ce projet associe des travaux sur CML humaines stimulées par un anticorps anti-HLA (W6/32) et des inhibiteurs des connexines, pharmacologiques (carbenoxolone), peptides bloquants (gap26 spécifique de Cx43), siRNA ou cellules mutantes). In vivo, nous utiliserons le modèle de xéno greffe développé par l'équipe, qui permet d'étudier le rôle des Ac anti HLA dans la VT : Des souris SCID/beige sont greffées avec des artères mésentériques humaines, et injectées de façon répétée avec W6/32. Ces souris développent des lésions de VT en quelques semaines, et représentent un outil de choix pour étudier l'effet protecteur d'agents thérapeutiques inhibiteurs de la VT.

Conclusions

Ce projet original ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ciblant la voie des jonctions-gap et leur lien avec les sphingolipides, ceci dans le but à moyen terme, de bloquer le développement de lésions de VG et prévenir le rejet chronique de greffe chez les patients.

BACCHETTA Justine : Suivi de la microarchitecture osseuse par tomographie périphérique quantitative de haute résolution chez le patient transplanté

Rationnel

Que ce soit une transplantation rénale avec les facteurs de risque osseux associés (ostéodystrophie rénale préexistante, malnutrition, inflammation chronique, hypogonadisme et protocoles d'immunosuppression souvent constitués en partie par des corticothérapies à fortes doses), ou une transplantation d'autre organe solide (avec une proportion substantielle de patients ostéoporotiques au moment de la greffe), le risque osseux dans la période post-greffe immédiate est notable. Le lien entre morbidité osseuse et cardiovasculaire est actuellement bien démontré. Le suivi osseux repose sur des outils biologiques, radiologiques et histologiques. L'ostéodensitométrie (DXA) est classiquement utilisée pour mesurer la masse osseuse, mais la tomographie périphérique quantitative de haute résolution (HR-pQCT) a l'avantage d'être une technique plus précise, permettant une étude tridimensionnelle de la microarchitecture trabéculaire et de la densité osseuse volumétrique compartimentale (totale, corticale, trabéculaire), tout en étant similaire à la DXA en terme d'irradiation (moins de 5 μ Sv). Le suivi général repose sur un suivi cardiaque (échographie cardiaque) et vasculaire (pression artérielle, doppler des troncs supra-aortiques) régulier.

Objectifs

L'objectif principal de TRANSOS, étude lyonnaise et stéphanoise, est d'évaluer l'évolution de la densité corticale au tibia entre baseline et 6 mois mesurés par HR-pQCT, avec secondairement une analyse de trajectoire des valeurs observées (baseline, 6 mois, 2 ans et 5 ans en fonction des financements obtenus), chez tous les patients de plus de 10 ans recevant une première greffe d'organe solide.

De plus, une collaboration internationale avec l'équipe du Professeur T Nickolas à l'université de Columbia (New York, USA), qui a un protocole similaire en cours, permettrait d'étudier l'impact des différents traitements immunosuppresseurs sur l'os après greffe, les protocoles de soins étant en effet différents entre les équipes françaises et américaines.

Résultats attendus

L'analyse des résultats permettra d'apporter un éclairage sur l'ostéo- et la vasculo-toxicité des différents immunosuppresseurs, et donc à terme d'adapter les protocoles d'immunosuppression en fonction des différents profils de patients. Comme les protocoles de recherche sont homogènes entre France et USA, cela permettrait à terme de proposer une méta-analyse des données individuelles, ce qui permettra vraiment d'améliorer nos connaissances sur le métabolisme osseux après greffe.

Méthodologie

TRANSOS est une cohorte prospective et longitudinale, des patients recevant une première greffe d'organe solide (rein, coeur, poumons, pancréas) au sein des CHU de Lyon et de Saint-Etienne, avec évaluation osseuse (DXA et HR-pQCT) et suivi biologique et cardiovasculaire classique.

CANQUE Bruno : Cartographie développementale du système immunitaire humain : implications pour la prise en charge des patients allogreffés

En dépit des efforts consentis depuis près de trois décennies, l'architecture développementale du système immunitaire humain reste à la fois mal connue et controversée. Faute de modèle adéquat, les caractères phénotypiques et fonctionnels des précurseurs qui sont à l'initiation des lignages lymphoïdes, granulo-macrophagique et dendritique, et davantage encore les déterminants intra- et extracellulaires de leur émergence et de leur spécification, demeurent mal définis. Les données de la littérature montrent par ailleurs qu'en ce domaine la situation murine ne peut faire l'objet d'une transposition mécanique à l'espèce humaine, l'hématopoïèse humaine présentant des caractères spécifiques d'espèce. Afin d'aborder cette problématique dans des conditions expérimentales robustes, nous avons développé un modèle d'étude in vivo de l'hématopoïèse humaine chez la souris immunodéficiente NSG fondé sur la greffe de progéniteurs hématopoïétiques du sang placentaire, ainsi qu'un outil d'analyse des populations médullaires par cytométrie en flux conventionnelle multiparamétrique (15 couleurs) qui permet de suivre l'ensemble des voies de différenciation d'une façon simultanée et comparative depuis le stade de progéniteur immature (CD34++Lin-CD38lo) jusqu'à celui d'effecteur mature ou semi-mature prêt à subir le processus d'intravasation sanguine, et ceci dans un seul tube d'analyse. Ce modèle a été validé par une étude comparative des populations générées in vivo en conditions xénogénique et de leurs contreparties physiologiques fœtales aux niveaux médullaires, sanguines et thymiques. L'objectif du présent programme est de produire une

cartographie phénotypique, fonctionnelle et moléculaire complète du système immunitaire en développement, et de clarifier les relations génétiques et développementales qui s'établissent à l'intérieur du lignage lymphoïde entre les populations T, B, NK et ILCs. Une étude clinique pilote utilisant le cocktail d'anticorps que nous avons défini sera également réalisée sur une cohorte de patients ayant subi une allogreffe de CSHs en vue d'étudier le phénotype des progéniteurs circulants et de définir des marqueurs prédictifs de la reconstitution immunitaire.

CHARREAU Béatrice : Définition et contrôle de l'inflammation microvasculaire au cours du rejet aigu tumoral en transplantation cardiaque : nouvelles cibles cellulaires et moléculaires

Le rejet humoral aigu survient précocement dans 6 à 10% des transplantations cardiaques. Ce rejet est un facteur de risque important pour le développement d'une vasculopathie du greffon et d'un rejet humoral chronique; il est associé à long terme à une baisse de survie du greffon et du patient transplanté. En transplantation cardiaque, le rejet humoral aigu se caractérise par une inflammation microvasculaire, une altération des cellules endothéliales et un infiltrat macrophagique intravasculaire. Les anticorps dirigés contre les antigènes HLA du donneur (DSA), l'activation du complément et la réponse inflammatoire sont les principaux effecteurs du rejet humoral. A ce jour, il n'existe pas de traitement dédié ni de marqueur histologique fiable du rejet humoral aigu. Nos travaux récents montrent que l'activation des cellules endothéliales favorise une interaction entre cellules endothéliales du greffon et les monocytes circulants qui va orienter la polarisation des macrophages vers un profil proinflammatoire de type M1. Nous avons identifié la voie de signalisation Notch et l'IL-6 comme médiateurs de cette polarisation. L'étude de biopsies de greffons cardiaques nous a permis de montrer une forte régulation d'ADAM10 et du ligand de Notch Dll4 dans les cellules endothéliales et les macrophages en contact dans les capillaires au cours de rejet humoral aigu. Ces résultats suggèrent que la polarisation des macrophages M1 est associée au rejet et indiquent que Dll4 et l'IL-6 participent à cette polarisation.

L'objectif de ce projet de caractériser in situ dans des biopsies de greffons les populations macrophagiques intravasculaires associées au rejet humoral aigu (pAMR2 selon la classification de Banff) au moyen de marqueurs spécifiques des populations M1 et M2. Nous utiliserons des modèles cellulaires de coculture de cellules endothéliales issues de patients transplantés cultivés avec des monocytes allogéniques purifiés (CD14+) et des modèles de différenciation de macrophages pour confirmer l'importance de du ligand Dll4 et de l'IL-6 dans la polarisation des macrophages M1. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques bloquants Dll4 et l'IL6R (dembicizumab and tocilizumab) pour prévenir la polarisation sera évaluée in vitro. La contribution des DSA et du complément dans l'activation de la voie Notch et la polarisation des M1 sera analysée dans des modèles cellulaires en préincubant les cellules endothéliales avec le sérum des patients et des fragments du complément. Enfin, l'ensemble des informations obtenues avec ces 3 approches sera utilisé pour évaluer la pertinence de nouveaux marqueurs de la voie Notch et de la différenciation des macrophages pour le diagnostic du rejet humoral aigu en transplantation cardiaque. A terme ce projet pourrait établir les bases pour développer des outils thérapeutiques (anticorps bloquants bivalents) et diagnostiques (nouveaux marqueurs histologiques) pour une meilleure détection et prévention du rejet humoral aigu et de ses conséquences.

CHATELET Valérie / LOBBEDEVZ Thierry : La précarité, estimée par l'European Deprivation Index, est-elle associée à l'échec de transplantation rénale?

Contexte :

La littérature anglo-saxonne montre que la précarité sociale et économique est associée à une augmentation du risque de perte du greffon, de rejet de greffe et de mortalité.

Il est admis que les déterminants sociaux de la santé sont multiples et ne peuvent être résumés en une seule mesure. Un indice composite de précarité sociale (European Deprivation Index [EDI]) a été récemment élaboré et validé dans sa version française. L'EDI est construit en s'appuyant sur un découpage du territoire en mailles de taille homogène appelées IRIS pour « Îlot Regroupé pour Information Statistique ». Cette étude géographique de la précarité, des patients transplantés rénaux permettrait d'identifier les IRIS plus défavorisés et d'étudier la relation entre l'EDI et les résultats de la greffe.

Description du projet et résultats attendus :

L'objectif principal de ce travail est d'estimer si la précarité évaluée par l'indice EDI est associée à l'échec de transplantation rénale défini par le retour en épuration extrarénale ou une 2^{ème} greffe avant dialyse.

Les objectifs secondaires sont l'évaluation de l'existence d'une association entre la précarité évaluée par l'EDI et la survie du greffon rénal sans rejet de greffe et la survie des patients.

Seront inclus dans cette étude les patients dialysés de plus de 18 ans, résidant en France métropolitaine, ayant reçu une première transplantation rénale à donneur cadavérique pendant la période 1er Janvier 2009 au 31 Décembre 2013, avec une date de point au 31 décembre 2014. Seront exclus les patients mineurs, non dialysés avant la greffe, ayant reçu une transplantation à donneur vivant ou une transplantation multi-organes et enfin les antécédents de greffe rénale ou d'un autre organe.

L'évènement d'intérêt est l'échec de transplantation rénale. Un géocodage sera réalisé à partir de l'adresse des patients à l'inscription afin d'attribuer à chaque patient la plus petite unité géographique disponible permettant la détermination de l'indice de précarité. L'EDI sera découpé en quintiles. Une analyse descriptive des données sera effectuée. L'incidence cumulée des différents événements (retour en dialyse, décès) sera représentée par méthode graphique et sous la forme d'un tableau de l'incidence cumulée des événements tous les 6 mois. Le cs-HR et le sd-HR de retour en dialyse et son IC95% seront estimés pour chaque variable avec un modèle de Cox à un facteur pour chacun des événements. Pour les variables quantitatives, la relation log linéaire entre la variable et l'évènement sera estimée par la méthode des splines avec un modèle de Cox. L'hypothèse de proportionnalité des risques sera vérifiée par la représentation graphique des résidus de Schoenfeld. Les sujets influents seront détectés par la méthode des dfb_{éta}. Pour l'analyse multivariée les variables seront sélectionnées par une valeur de $p < 0.20$ en analyse bivariée. L'indice de précarité sera entré dans l'analyse multivariée à priori en quintiles.

Nous émettons l'hypothèse que les inégalités socio-économiques en France, évaluées par l'indice de précarité EDI, sont associées à la survie du greffon rénal. La mise en évidence d'un lien entre la précarité et l'échec de greffe pourrait donner lieu à une modification des pratiques avec la mise en place d'actions ciblées (éducation thérapeutique du patient, mise en place du concept de navigateur) permettant d'améliorer la survie des greffons rénaux et plus généralement la survie des patients.

Sources des données :

Base de données CRISTAL après obtention de l'accord des centres

Base de données DIADEM

CHIFFOLEAU Elise : Déterminer le rôle de CLEC-1 dans les cellules dendritiques humaines et la polarisation des LT CD4+ Th17

Nous proposons dans ce projet d'analyser la fonction de CLEC-1, un récepteur « lectin-like » de type C, que nous avons identifié comme étant sur-exprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. CLEC-1 appartient à la famille des gènes « lectin-like » codant pour des protéines ayant des fonctions importantes dans la réponse immune des cellules myéloïdes et pouvant posséder à la fois des ligands exogènes et endogènes. CLEC-1 est un récepteur orphelin qui avait été décrit précédemment comme étant exprimé par les cellules dendritiques (DCs) et endothéliales, cependant sa fonction n'avait pas été étudiée.

Nous avons publié que CLEC-1 est exprimé par les cellules myéloïdes dont les DCs chez le rat et est diminuée par des stimuli pro-inflammatoires et augmentée par les cellules T CD4+CD25+ régulatrices ou l'IL-10. D'autre part, nous avons montré que CLEC-1 modère la réponse secondaire Th17 des LT CD4+ en Réaction Lymphocytaire Mixte (MLR) chez le rat. Depuis, nous avons généré une protéine de fusion CLEC-1 Fc de rat et observé que bloquer l'interaction CLEC-1/CLEC-1L augmente la réponse proliférative des LT et la sécrétion d'IL-17. D'autre part, la génération de rat KO pour CLEC-1 a permis de confirmer ce rôle dans le contrôle de la réponse effectrice Th17. Chez l'Homme, nous observons que la protéine recombinante CLEC-1 humaine inhibe la prolifération des LT en MLR. D'autre part, la génération d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie humaine extra-cellulaire de CLEC-1 montre que CLEC-1 est exprimé à la surface des DC humaines dérivées des monocytes (moDCs) et est diminué par des stimuli pro-inflammatoires. De façon intéressante, les moDC cultivées en présence de la cytokine régulatrice IL-10 (DC10) et possédant des propriétés régulatrices expriment de plus fortes quantités de CLEC-1.

Notre projet présenté ici vise à étudier la fonction de CLEC-1 dans les DC humaines. Nous testerons l'effet agoniste de l'anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire de CLEC-1 (qui mimerait

le ligand) sur l'activation, la maturation et la capacité des DCs humaines à moduler la réponse Th17. D'autre part, cet anticorps permettra d'étudier la voie de signalisation de CLEC-1 inconnue à ce jour en étudiant la phosphorylation de protéines. A l'inverse, nous utiliserons des siRNA pour inhiber l'expression de CLEC-1 dans les DC et DC-10 et analyserons l'effet sur leur capacité à différencier des cellules T CD4+ effectrices (en MLR).

Les réponses Th17 sont associées aux rejets en transplantation mais aussi aux inflammations chroniques ou aux maladies auto-immunes et sont également cruciales pour la défense envers les bactéries extracellulaires, les champignons et les parasites. Par conséquent, il existe un fort intérêt à identifier et à étudier des facteurs cellulaires tel que CLEC-1 pour limiter une inflammation de type Th17 excessive ou erronée. Nous disposons dans le laboratoire de la technologie et du savoir-faire pour développer ce projet sur 2 ans.

COMPAGNON Philippe : La machine de perfusion transportable Airdrive®, une nouvelle approche pour augmenter en toute sécurité le pool de donneur et optimiser l'organisation logistique de la transplantation hépatique.

La transplantation hépatique est victime de son succès et doit faire face à une pénurie de greffons. Améliorer la qualité du greffon représente un moyen de favoriser son fonctionnement immédiat et aussi une façon de réduire la pénurie d'organes en autorisant l'accès à un pool de donneurs "non idéaux" comme les greffons stéatosiques, les greffons soumis à une période prolongée de conservation et les greffons des donneurs décédés par arrêt cardiaque (DDAC). La conservation par machine de perfusion représente un autre concept de conservation des greffons hépatiques qui apporte de nombreux avantages et offre l'opportunité d'augmenter avec plus de sécurité le nombre d'organes utilisables. Nous avons établi récemment une collaboration avec une équipe de l'université d'Amsterdam qui a mis au point une machine de perfusion transportable dédiée au foie (Airdrive®). En utilisant un modèle de DDAC chez le porc, nous avons pu montrer un effet protecteur d'Airdrive® avec une meilleure survie des animaux à J5 (100% vs. 0%), une meilleure reprise de fonction immédiate, une diminution de la souffrance hépatocytaire et des lésions biliaires par rapport à des foies conservés en ischémie froide (IF). Cet effet bénéfique était associé à une diminution de la réponse inflammatoire, de l'apoptose, du stress oxydant et du stress du réticulum endoplasmique.

L'objectif de ce projet est double i) évaluer l'efficacité d'Airdrive® pour la conservation des foies stéatosiques et ii) évaluer les performances d'Airdrive® pour une période prolongée de conservation.

Méthodologie :

Un modèle de transplantation hépatique chez le porc sera utilisé. Tache 1 : Evaluation d'Airdrive® pour la conservation des foies stéatosiques. La stéatose chez les donneurs sera induite par administration IV de streptozotocine et régime hypercalorique pendant 5 semaines; Les foies prélevés seront conservés 4h à 4°C en ischémie froide ou par Airdrive® avant d'être transplantés. Tache 2 : Evaluation d'Airdrive® pour une période prolongée de conservation (20h). Les foies prélevés seront conservés 20h à 4°C en ischémie froide ou par Airdrive® avant d'être transplantés.

Le critère de jugement principal sera le taux de survie des animaux receveurs au 5ème jour post-transplantation et le taux de non fonction primaire. Les critères secondaires de jugement incluront l'incidence du syndrome post-reperfusion, la fonction hépatique, une analyse histologique ainsi qu'une analyse biochimique et moléculaire des lésions d'ischémie-reperfusion. Les paramètres seront analysés avant (ex-vivo) et après implantation (monitoring journalier des animaux) à la fois sur des échantillons de perfusât (flush-out), sanguins et tissulaires. Des paramètres habituels d'évaluation des lésions hépatocellulaires, endothéliales et mitochondriales seront analysés. Les mécanismes sous-tendant l'effet protecteur d'Airdrive® seront évalués à travers l'analyse de la réponse inflammatoire, du stress oxydant, de l'apoptose, du métabolisme énergétique, et du stress du réticulum endoplasmique.

Résultats attendus et perspectives : Ce travail devrait confirmer la supériorité d'Airdrive® sur l'IF pour la conservation des greffons stéatosiques et montrer aussi qu'elle autorise des durées de conservation prolongées en toute sécurité; Airdrive® pourrait permettre d'élargir l'accès à ce pool des donneurs « non idéaux ». En cas de résultats probants, nous envisageons de tester cette machine en situation clinique à travers une étude pilote.

CONTI Filomena : Evaluation de la prévalence et de la réponse à la vaccination avant transplantation hépatique

Les patients cirrhotiques en attente de transplantation hépatique (TH) ont une maladie évoluée qui s'accompagne d'un déficit immunitaire spontané. Ils sont donc exposés à un risque accru d'infections sévères, qui sont responsable de 40 à 50% de la mortalité des patients en attente de TH. L'immunosuppression et le risque infectieux qui en découle sont d'autant plus importants que la cirrhose est grave. La prévention des infections représente un enjeu important pour ces patients et repose selon les cas sur les mesures d'hygiène, l'antibioprophylaxie, l'administration d'immunoglobulines et la vaccination.

Les données disponibles concernant la vaccination des patients cirrhotiques sont peu nombreuses. Les éléments nécessaires à prendre en compte comportent la tolérance du vaccin et son impact éventuel sur la maladie sous-jacente, l'immunogénicité du vaccin et son efficacité clinique.

Nous souhaitons réaliser une étude prospective évaluant la prévalence et la réponse aux vaccinations recommandées chez les patients cirrhotiques en attente de TH. Malgré les recommandations vaccinales qui ont été élaborées par le HCSP en 2012, ce type d'étude n'a jamais été réalisé.

Nous allons, dans un premier temps, évaluer la prévalence des patients vaccinés dans notre cohorte de patients en attente de TH qui est actuellement de 200 patients, et au cours d'une année d'activité, environ 120 nouveaux patients seront inscrits sur liste d'attente. Nous aurons ainsi une cohorte de 300 patients.

Ceci sera réalisé grâce à la distribution d'un questionnaire sur la vaccination lors d'une consultation pré-TH et la réalisation de différentes sérologies virales (certaines faites de routine au cours du bilan pré-transplantation, d'autres ajoutées comme les sérologies pneumococcique, rougeoleuse, rubéoleuse et amarile).

Nous obtiendrons de cette façon la prévalence des patients vaccinés ou protégés dans cette population ce qui à ce jour n'est pas connu.

Nous réaliserons ensuite les vaccinations recommandées chez les patients non protégés et les patients seront suivis pour une période d'au moins un an post-vaccination, qu'ils soient transplantés ou non pendant cette période. Un suivi clinique ainsi que les sérologies de contrôle des vaccinations seront réalisés régulièrement, ce qui nous permettra d'évaluer la protection clinique, l'immunogénicité, et d'estimer la durée de protection de notre cohorte de patients.

D'AVENI Maud : Ingénierie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton dans la réaction du greffon contre l'hôte

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques demeure le seul traitement curatif dans de nombreuses hémopathies malignes et certaines tumeurs solides. L'effet anti-tumoral de cette approche d'immunothérapie cellulaire, appelé effet du Greffon contre la Leucémie (GVL) est le plus souvent associé au développement d'une réponse T cytotoxique dirigée contre les tissus sains du receveur. Cette réaction est appelée maladie du greffon contre l'hôte (GVH) et est responsable de lésions cutanées, digestives et hépatiques qui peuvent se compliquer d'une morbidité et mortalité élevées, et n'est parfois que partiellement contrôlable par les immunosuppresseurs. De nombreuses études ont montré l'intérêt des Cellules Souches Mésenchymateuses prélevées dans la moelle osseuse de donneur (CSM-MO) comme thérapie cellulaire curative de la GVH, compte tenu de leur faible immunogénicité et de leurs propriétés immunorégulatrices. Cependant le recueil de CSM-MO nécessite un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie général d'un donneur, avec un rendement d'autant plus faible que l'âge du donneur avance. La gelée de Wharton (tissu conjonctival du cordon ombilical) contient des CSM qui ont une plus grande capacité d'auto-renouvellement, prélevable au décours de l'accouchement sans controverse éthique, et constitue ainsi une source alternative de cellules. L'isolement des CSM à partir de la gelée de Wharton, a été décrit pour la première fois par Zhou et al (Cell Immunol 2011). Ces CSM-GW ont les mêmes propriétés morphologiques, phénotypiques, immunogéniques et immunorégulatrices vis-à-vis des LT que les CSM-MO. In vitro, leurs propriétés immunorégulatrices semblent dépendantes à la fois de facteurs solubles et membranaires. Des études préliminaires dans le laboratoire ont étudié les propriétés in vitro des CSM-GW. Nous avons identifié que le contact cellulaire et la modification de l'environnement cytokinique (IL-6, IL-1 β , IL-10 et IL-8) pouvaient être impliqués dans l'immunorégulation du système immunitaire. Nous souhaitons donc identifier les mécanismes exacts impliqués entre CSM-GW et LT allo-réactifs, in vitro et in vivo dans un modèle pré-clinique de GVH chez la souris.

DUCLOS-VALLEE Jean-Charles : Microbiote et tolérance en transplantation hépatique : application au modèle du rejet aigu

Le microbiote intestinal (MI) est un organe à part entière qui possède des fonctions métaboliques et immunologiques indispensables au maintien d'une homéostasie cellulaire. Montrer l'implication du MI dans l'apparition d'un rejet aigu (RA) hépatique est essentiel pour appréhender des hypothèses pathogéniques et des perspectives thérapeutiques.

Objectif principal :

Identifier des profils bactériens spécifiques du MI chez des patients avec RA modéré à sévère histologiquement prouvé (score de Banff 6) après transplantation hépatique (TH) par rapport à des témoins sans RA.

Résultats attendus :

Mise en évidence d'un profil bactérien particulier chez les patients avec RA après TH

Méthodologie :

Etude prospective, monocentrique, non interventionnelle avec collection biologique et recueil de données associées. Les selles des patients inclus seront recueillies au moment de l'inscription du patient sur liste de transplantation, au moment du RA, 15 jours et 6 mois après transplantation; après préparation, elles seront stockées au sein de l'unité INSERM UMR-996 jusqu'à sélection selon la survenue de RA et l'appariement, puis analyse. Des prélèvements sanguins, salivaires et urinaires seront réalisés et les données cliniques recueillies à chacune de ces visites.

La comparaison de 27 patients présentant un RA modéré à sévère versus 54 patients sans rejet permettra de détecter une différence de quantité de germe minimale de 1,7% (DS 2% ; alpha 1% ; formulation bilatérale) avec une puissance de 80%. Du fait d'une prévalence de RA modéré à sévère d'environ 15% on inclura 200 patients parmi lesquels seront retenus 30 patients (27 évaluables) avec RA, et 60 patients (54 évaluables) sans RA, appariés selon l'indication de TH et le type d'immunosuppresseurs.

La durée totale de l'étude sera de 36 mois : 24 mois d'inclusion, durée d'attente sur la liste de transplantation et 6 mois de suivi post TH par patient.

FILATRE Pierre : Oxygénation par membrane extracorporelle et suivi des médicaments de l'infection - ECMOTION

Objectif :

L'assistance par ExtraCorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) est une circulation extracorporelle avec oxygénateur, utilisée pour la prise en charge des patients atteints d'insuffisance respiratoire et/ou circulatoire réfractaire. Un grand nombre de ces patients sont des patients en attente de transplantation ou en phase aiguë post-transplantation.

L'utilisation de l'ECMO modifie la pharmacocinétique (PK) des médicaments. Ainsi, l'ECMO entraîne des variations de concentrations des médicaments par modification du volume de distribution et de la clairance des médicaments et/ou séquestration des molécules dans le circuit d'ECMO.

La PK des médicaments chez le patient traité par ECMO est largement méconnue. La connaissance de cette PK est pourtant cruciale pour les médicaments anti-infectieux dont la concentration est liée à leur effet. Une sous-exposition en anti-infectieux constitue une perte de chance importante pour le patient, une surexposition entrainera une augmentation des effets indésirables ; la population de patients traités par ECMO étant une population déjà fragilisée.

En période pré-opératoire, le sepsis constitue une contre-indication à la transplantation alors même que les patients traités par ECMO doivent être transplantés de manière urgente. L'infection doit alors être contrôlée au plus vite en utilisant des posologies d'antibactérien adaptées. A la période postopératoire,

l'ECMO est indiquée en cas de dysfonction d'organe. Chez ces patients immunodéprimés, le traitement antibactérien se doit d'être le plus efficace possible afin de préserver le fonctionnement du greffon.

L'objectif du projet est d'étudier la PK des médicaments anti-infectieux au cours de l'ECMO en : i) caractérisant les interactions existantes entre ces médicaments et les différents composants du circuit d'ECMO, en ii) étudiant ex-vivo dans les conditions de fonctionnement usuelles du circuit (37°C, en présence d'oxygène) l'évolution des concentrations sanguines des médicaments anti-infectieux, en iii) déterminant, chez le patient bénéficiant d'ECMO, l'impact du dispositif sur la PK des médicaments anti-infectieux et finalement en iv) modélisant la PK de deux anti-infectieux (la piperacilline et l'amikacine) lors de l'ECMO et en comparant les données obtenues chez les patients traités par ECMO à celle d'un groupe contrôle (patients de réanimation non traité par ECMO).

Résultats attendus :

Une meilleure connaissance de la PK des anti-infectieux chez les patients transplantés traités par ECMO est attendue, permettant ainsi de mieux évaluer les anti-infectieux à risque de sous-exposition et de surexposition et ainsi de proposer des adaptations de posologies de ces médicaments afin d'éviter le risque d'inefficacité ou de toxicité du traitement.

Méthodologie :

Pour les parties in-vitro et ex-vivo, il s'agit d'une étude observationnelle de PK ne faisant donc pas intervenir le patient qui vise à déterminer l'impact des constituants sur les concentrations en médicaments.

Pour la dernière partie, il s'agit d'une étude de PK observationnelle comparative, sans aucune modification de prise en charge thérapeutique des patients, entre patients de réanimation traités par ECMO et patients de réanimation sans ECMO (groupe contrôle) visant à déterminer l'impact de l'ECMO sur la PK des médicaments anti-infectieux.

GEORGET Gilles : Lever les freins professionnels au prélèvement de cornées par la communication engageante

Chez les soignants (médicaux et paramédicaux), les réticences au prélèvement d'organes et encore plus au prélèvement de tissus sont masquées par la notion de respect implicite d'une mission de santé publique. L'aide fournie aux CHPOT est extrêmement variable et les résultats du prélèvement de cornées varient de 1 à 15 selon les équipes.

Dans une équipe idéale, le prélèvement de cornées (jours ouvrables) doit pouvoir atteindre 10 % des décès de façon pérenne, avec un taux de cornées éligibles à la greffe se rapprochant de 70%. A ce jour, au CHU de Toulouse, cet objectif n'est rempli qu'à 25%.

Les contraintes matérielles et techniques doivent être maîtrisées et font l'objet d'un autre travail. Plus méconnue est la relative indifférence allant parfois jusqu'à l'obstruction à l'encontre de cette activité de la part des autres soignants susceptibles de fournir une aide quelle qu'elle soit. Les raisons sociétales ou personnelles de cette réticence font l'objet de recherches théoriques dont les résultats connus sont peu applicables en pratique.

Nous avons choisi une approche stratégique pragmatique de marketing social pour améliorer le processus de prélèvement de cornées. Il s'agit d'amener les soignants à réaliser leur mission de santé publique quelle que soit leur position face à celle-ci.

Résultats attendus :

- création d'une méthodologie d'étude de la population soignante concernée ;
- identification d'un vocabulaire utile ou contre-performant ;
- création d'une séquence engageante reproductible d'un service à l'autre ;
- création d'une modélisation de la communication intra-hospitalière sur le sujet, susceptible d'être appliquée par d'autres CHPOT, susceptible d'être enseignée ;
- création d'indicateurs de suivi d'efficacité, utilisables par toutes les CHPOT ;
- amélioration des résultats du CHU de Toulouse en termes de prélèvement de cornées.

Méthodologie :

- étude psychologique des réticences dans la population cible ;
- création d'un modèle de communication engageante simple, type pied-dans-la-porte ;
- application du modèle à un service cible important ;
- relevés des résultats au fil de l'eau avec un pointage trimestriel, suivi des index ;
- comparaison des résultats du prélèvement de cornées avec les données antérieures connues depuis dix ans et avec des services témoins;
- analyse ;
- rédaction d'un modèle de communication réutilisable par d'autres CHPOT.

Durée du projet 18 à 24 mois : 3 mois d'étude psychologique, 2 mois d'écriture du scénario engageant avec formation des IDE de la CHPOT, 12 mois d'activité, 2 mois pour analyse et rédaction.

Suites espérées :

- publication dans une revue spécialisée de psychologie sociale ;
- publication dans une revue de transplantation et/ou d'ophtalmologie
- présentation aux journées de l'Agence de la biomédecine ;
- évolution des modules de formation Abm concernés par le processus.

GUILLONEAU Carole : Nouvelle immunothérapie tolérogène dans le traitement du rejet de greffe de cœur et la GVHD aigüe

Le rejet d'un greffon vascularisé et la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) dans la greffe de moelle osseuse sont deux situations physiopathologiques nécessitant de nouveaux traitements immunosuppresseurs plus efficaces et spécifiques. L'induction d'une tolérance immune vis-à-vis des alloantigènes reconnus dans ces conditions permettrait à la fois d'éviter ces pathologies, de diminuer les doses d'immunosuppresseurs et ses effets secondaires et de préserver des réponses immunitaires nécessaires pour une surveillance contre les agents infectieux pathogènes et les cellules cancéreuses. Les Tregs CD8+ ont été associées dans la littérature à moins d'épisodes de rejet et même l'induction de tolérance. Nous avons montré dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat que la survie du greffon était associée à la présence de Tregs CD8+CD45RClow spécifiques d'antigènes du donneur dérivés de molécules de CMHII (Guillonnet, JCI, 2007)(Picarda, JCI, 2014). Ce projet propose d'utiliser les spécificités des Tregs CD8+CD45RClow pour mettre en place une nouvelle stratégie thérapeutique (brevet EP14 306 231.3). Nous postulons que le ciblage de CD45RC (en utilisant un anticorps anti-CD45RC) permettrait d'éliminer les cellules effectrices (positives pour CD45RC), tout en préservant et en augmentant les Tregs (négatives pour CD45RC).

1) Génération et sélection d'un anticorps déplaçant anti-CD45RC humain favorisant la génération de Tregs CD45RC- et l'induction de tolérance;

2) Etude et analyse des mécanismes d'action de l'anticorps (en comparaison avec nos résultats préliminaires obtenus chez le rat)

3) Preuve de concept préclinique dans un modèle de GVHD chez la souris humanisée et étude chez l'homme

La mise en oeuvre de ce projet aura un potentiel clinique important en rejet de greffe, maladies auto-immunes, allergies et d'autres situations où les réponses immunitaires destructrices peuvent se produire comme la thérapie génique ou l'immunisation contre des protéines thérapeutiques (comme pour le facteur VIII par exemple).

IVANOVIC Zoran : Réalisation des greffons hématopoïétiques à partir de cellules CD34+ récupérées par cytophèrese sans mobilisation et amplifiées ex vivo

On sait que dans le sang périphérique en état d'équilibre physiologique (sujets sains, sans mobilisation) circulent, dans la population des cellules CD34+ (CD34+NonMob) des progéniteurs hématopoïétiques engagés et des cellules souches ayant une la capacité de reconstitution à « court terme » (LTC-IC and SRC). Ces dernières ont une faible capacité de greffe. Récemment notre équipe a démontré (Brunet de la Grange et al, Stem Cell Res 2013), en utilisant le modèle de greffe « en série » des souris NOD/Scid, l'existence parmi des CD34+NonMob des cellules souches primitives, ayant une capacité de greffe à long terme. De plus, nous avons démontré qu'une culture d'expansion ex vivo des cellules CD34+NonMob améliore de façon spectaculaire la « greffabilité » de ces cellules souches, tout en augmentant leur nombre. Nos travaux (publication en préparation) ont également montré que ceci vient très probablement du fait qu'une proportion importante des CD34+NonMob, négatives pour CXCR4 expriment cette molécule lors de la culture.

Dans un autre axe de recherche, nous avons conçu et mis au point un procédé d'expansion des cellules progénitrices et souches hématopoïétiques du sang placentaire avec une production de lots cliniques (protocole GRAPA). 14 patients ont reçu uniquement des cellules d'une USP amplifiée ex vivo. Les résultats montrent une reconstitution hématopoïétique rapide et durable (manuscrit en préparation).

Ces données réaffirment l'intérêt des cellules CD34+NonMob car, si elles sont amplifiées ex vivo, théoriquement, une(ou deux) cytophèreses simples, sans mobilisation, pourraient permettre d'obtenir un bon greffon hématopoïétique,

L'objectif de ce projet est de mettre au point un procédé d'expansion ex vivo à partir des CD34+NonMob suffisamment efficace pour assurer la prise de greffe rapide et durable.

Pour ce faire, nous allons appliquer le concept « Oxygen Stem Cell Paradigm (Ivanovic, J Cell Physiol 2009, Regen Med 2013) aux cultures d'expansion. Nous allons tester les cocktails de cytokines incluant celles qui interfèrent avec la réponse dite « hypoxique » de la cellule (notamment SCF et Tpo qui stabilisent HIF1a) ainsi qu'un autre régulateur– Notch ligand (NotchL). Ces facteurs ont été déjà utilisés pour le maintien des cellules souches lors d'une culture produisant des progéniteurs engagés ex vivo. Ils seront associés à un milieu anti oxydatif (HP01) dont l'efficacité est d'ores et déjà prouvée dans nos protocoles précliniques et cliniques (Ivanovic et al Transfusion 2003, Boiron et al Transfusion 2006, Ivanovic et al Cell Transpl 2011, Duchez et al Cell Transpl 2012). Une fois défini

dans les cultures de petit volume, le protocole optimal sera transféré en cultures « grandeur nature » effectuées dans un environnement « MTI-PP » sous « assurance qualité » et définition des paramètres de contrôle qualité applicable dans un essai clinique. La capacité de greffe à court terme et à long terme sera également évaluée par une greffe expérimentale des receveurs (souris NSG) primaires et secondaires, respectivement.

Si les résultats s'avèrent se révèlent satisfaisants, cette approche basée sur les CD34+NonMob pourrait rendre inutile la mobilisation par G-CSF ou G-CSF-Plerixafor et simplifier la logistique de greffe. Ainsi, elle pourrait surpasser des problèmes liés aux contre-indications pour la mobilisation.

LAUNAY David : Identification de cibles antigéniques spécifiques de la maladie du greffon contre l'hôte chronique sclérodermiforme comparé à la sclérodermie systémique par une approche immunoprotéomique bidimensionnelle en fluorescence

La réaction du greffon contre l'hôte chronique (GVHc) est une des complications sévères de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. L'atteinte cutanée au cours de la GVHc peut présenter des similitudes avec une autre maladie fibrosante systémique : la sclérodermie systémique (ScS) qui touche la peau et les viscères. On parle de GVHc sclérodermiforme. Les physiopathologies de la GVHc et de la ScS présentent également des points communs, avec notamment une activation importante du système immunitaire humoral et la production d'autoanticorps dont certains sont très importants pour le diagnostic ou la physiopathologie de ces deux maladies (ex : anti PDGFR, anti-fibrilline).

Objectifs : l'objectif principal est d'étudier et de comparer sans a priori les répertoires autoréactifs d'isotype IgG des patients ayant une GVHc sclérodermiforme à ceux ayant une SSc et de sujets témoins sains. Ce répertoire autoimmun sera évalué vis-à-vis des cibles antigéniques provenant de cellules Hep-2, cellules couramment utilisées en diagnostic médical courant de maladies auto-immunes. Les cibles antigéniques d'intérêt seront caractérisées par une approche immunoprotéomique innovante (immunoprotéomique bidimensionnelle en fluorescence – IPBDF) mise au point par notre laboratoire.

Résultats attendus : l'identification des antigènes cibles communs mais aussi spécifiques à la GVHc sclérodermiforme et à la ScS pourrait apporter des renseignements précieux dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques (donc avec des innovations thérapeutiques potentielles) de ces deux maladies proches sur le plan clinique et ainsi que l'identification de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques (mise au point de biomarqueurs sériques).

Méthodologie : Les cibles antigéniques seront identifiées et caractérisées par une approche immunoprotéomique bidimensionnelle en fluorescence. Les cibles antigéniques caractérisées seront confirmées par westernblot et ELISA.

ORTONNE Nicolas : Caractérisation des effecteurs cytotoxiques et des mécanismes de mort cellulaire au cours du rejet de transplantation de face

Objectifs : L'étude concerne 7 patients transplantés de face au CHU Mondor (délai de suivi de 2 mois à 7 ans). Nos objectifs sont 1) décrire les événements indésirables survenus au décours de la greffe, 2) caractériser les effecteurs cellulaires et moléculaires du rejet aigu et les mécanismes de mort kératinocytaire 2) étudier la validité diagnostique du score de Banff 2007 sur la muqueuse 3) chercher l'existence d'un rejet humoral 4) décrire le rejet cellulaire chronique

Résultats attendus :

1) Le rejet cellulaire implique des lymphocytes T cytotoxiques, exprimant des protéines de cytotoxicité de la voie perforine/granzyme, mais une intervention d'acteur de l'immunité innée, d'autres voies de cytotoxicité, voire de facteurs solubles pro-apoptotiques peut-être envisagée, pouvant à terme dégager de nouvelles perspectives thérapeutiques.

2) La caractérisation des sous-populations lymphocytaires dans les infiltrats de la peau et de la muqueuse, en particulier les cellules effectrices cytotoxiques et les cellules régulatrices exprimant FoxP3 pourrait peut-être améliorer la caractérisation du rejet reposant actuellement sur la seule densité des infiltrats et la mort kératinocytaire (Banff 2007).

3) Le suivi prolongé a permis l'identification histologique de rejets cellulaires chroniques, prenant parfois l'aspect de maladies auto-immunes (aspects vitiligoïde et de type lupus). Leur caractéristiques anatomocliniques et leur signification pronostiques sont actuellement inconnues.

4) Si la mort cellulaire est probablement de nature apoptotique, il est possible que d'autres voies de mort cellulaire plus récemment décrites soient mises en jeu, en particulier le processus de nécroptose, dont les voies d'activations diffèrent de celle de l'apoptose.

5) la prévalence du rejet humoral et sa signification pronostique sont actuellement mal connues, avec seulement quelques cas isolés rapportés.

Méthodologie :

L'étude rétro-prospective comportera :

1) L'inventaire et la description des complications cutanéomuqueuses non immunologiques ayant été biopsiées survenues au décours de la greffe chez les 7 patients : infections, lymphoprolifération, récurrence tumorale (NF1).

2) L'analyse des épisodes de rejet :

Elle sera faite dans les biopsies montrant un infiltrat de grade ≥ 2 avec évaluations semi-quantitatives en simple et parfois doubles marquages.

- Les effecteurs cellulaires seront identifiés par immunohistochimie (TCRbeta, CD20, CD3, CD8, CD123, CD138, CD56, CD1a, CD163). La sous-population T régulatrice sera évaluée par marquage du facteur de transcription FoxP3.

- Les effecteurs moléculaires seront étudiés par immuno-histochimie, qPCR et technique Luminex, avec étude de l'expression in situ de granzyme, perforine, TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis), TNFalpha, Fas (CD95), Fas L, TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) et TRAIL-R, granzyme.

- Les mécanismes de mort cellulaire (apoptose et nécroptose) seront étudiés in situ par la méthode TUNEL (apoptose), et immunomarquage spécifique de RIP3 kinase.

3) La recherche de rejet humoral

La recherche de DSA (donor specific antibodies) effectuée dans le sang corrélée au marquage avec l'anticorps anti C4d en immunofluorescence pourrait permettre d'identifier les lésions histologiques de rejet humoral aigu.

4) Etude de corrélations

Nous évaluerons la corrélation entre 1) le rejet et la densité de l'infiltrat (Banff 2007) dans la peau et la muqueuse, 2) le rejet dans la peau et l'expression des marqueurs de cytotoxicité, la proportion de cellules T-régulatrices, et l'expression des marqueurs de mort cellulaire dans la muqueuse 3) la valeur pronostique des sous populations lymphocytaires au cours du rejet

Ces données seront confrontées au suivi clinique et histologique afin de déterminer leur valeur pronostique

ROBIN Marie : Impact du ruxolitinib sur les profils immunitaires et hématologiques pré-allogreffe de moelle et post allogreffe de moelle chez les patients atteints de myélofibrose

Objectifs : l'objectif de cette étude biologique est d'analyser l'impact d'un inhibiteur de JAK2 le ruxolitinib sur l'hématopoïèse normale et pathologique et sur l'immunité innée et spécifique. En particulier, il est prévu d'analyser l'impact du ruxolitinib donné juste avant la greffe sur l'immunité post greffe immédiate et tardive.

Résultats attendus

Cette étude biologique est rattachée à un protocole prospectif de phase II déjà ouvert et ayant inclus 21 patients à ce jour et prévoyant l'inclusion de 53 patients greffés : inhibiteurs de JAK2, ruxolitinib avant allogreffe de moelle osseuse pour des patients atteints de myélofibrose primitive ou secondaire : JAK ALLO.

Les objectifs seront :

(1) de vérifier le rôle « anti-inflammatoire » du ruxolitinib, l'inhibition des fonctions lymphocytaires T, et la modulation des compartiments lymphocytaires (augmentation des lymphocytes régulateurs)

(2) d'analyser les potentiels réactions immunitaires et cytokiniques au décours immédiat de l'arrêt du ruxolitinib, c'est-à-dire pendant le conditionnement de la greffe et dans la phase précoce post-greffe en comparant les patients ayant reçu du ruxolitinib à des patients n'ayant pas reçu de ruxolitinib. Effectivement, il a été décrit des « rebond » de la maladie à l'arrêt du ruxolitinib, c'est-à-dire une réapparition des symptômes de la maladie mais aussi « des réactions inflammatoires » assimilées à des sepsis qu'il convient de documenter sur le plan biologique.

(3) d'analyser les reconstitutions immunologiques plus tardives (en comparaison avec une cohorte n'ayant jamais reçu de ruxolitinib) après la greffe, à 3, 6 et 12 mois ; effectivement, le ruxolitinib a été incriminé comme induisant un déficit immunitaire favorisant les infections opportunistes (toxoplasmose, pneumocytose...)(Goldberg, Reichel et al. 2013; Wysham, Sullivan et al. 2013)

(4) corréler les réponses immunitaires aux réponses hématologiques et moléculaires pré-greffe sous ruxolitinib et post-greffe en mettre en évidence avec mise en évidence d'une potentielle réaction du greffon contre la myélofibrose ; nous prévoyons de suivre l'évolution de la maladie grâce à des marqueurs biologiques plasmatiques, cellulaires et moléculaires et de vérifier si certains de ces marqueurs s'associent au statut de la maladie (rémission, progression, signes généraux) ou sont corrélées à certaines réponses immunitaires, sous ruxolitinib et post-greffe

Méthodologie

Marqueurs cellulaires (Institut Pasteur)

La fraction CD34 est purifiée en HSC/HPC puis des marquages progéniteurs, myéloïdes, monocytaires et de l'activation des protéines STAT sont effectués. Les cellules non CD34+ seront également analysées (fraction non fixée aux billes) :

-Les mégakaryocytes circulants seront évalués par cytométrie de flux (CD41a, CD61)

-Les sous populations lymphocytaires T (Th1, Th2, TH17, T régulatrices), B et NK seront évaluées par cytométrie de flux avec un panel multicolore permettant de différencier les cellules naives, mémoires, activées

Dosage de cytokines (Institut Pasteur)

Les cytokines (pro-inflammatoire, marqueurs de maladie) seront mesurées dans les sérums soit par des techniques d'ELISA pour des marqueurs non encore disponible sur des techniques de LUMINEX soit par LUMINEX permettant de tester un grand nombre de cytokines en même temps.

Marqueurs moléculaires

Les panels de gènes seront testés par une technique de re-séquençage ciblé. Des PCR quantitatives évalueront la quantité de transcrit JAK2V617F.

SAVIER Eric : Survie des greffons et des patients après conservation parmi 5 solutions en transplantation hépatique

Objectifs : La réussite d'une greffe d'organe dépend en grande partie de la qualité du greffon et donc de la qualité de sa préservation. De nombreuses solutions de conservation sont actuellement disponibles, mais les études cliniques comparatives sont rares et aucune différence majeure n'a été mise en évidence par des études prospectives randomisées. En revanche l'analyse de registres UNOS ou européen (ELTR) montraient un effet délétère de la solution Custodiol (HTK). Par conséquent, toutes les solutions de conservation ne semblent pas équivalentes. Une étude observationnelle multicentrique, nationale, indépendante, à partir des données de la base Cristal (Agence de la Biomédecine) permettrait de comparer les résultats des transplantations hépatiques effectuées après conservation avec l'une des solutions le plus souvent utilisée :

Celsior®, IGL-1®, SCOT-15®, Custodiol® (HTK) ou le Viaspan® (UW). Cette base de données est unique par l'homogénéité nationale et par l'absence d'utilisation exclusive.

Objectif principal : comparer la survie des greffons et des patients à 1, 3 et 5 ans après conservation dans différentes solutions de conservation.

Objectifs secondaires : Déterminer par une analyse multifactorielle, si une solution de conservation doit être préférée en fonction des caractéristiques du donneur, des conditions de la greffe, des caractéristiques du receveur.

Résultats attendus : Fournir des données objectives sur la survie à long terme des greffons et des patients après transplantation hépatique. Permettre à chaque centre de transplantation de choisir la solution qui lui semble la plus appropriée et éventuellement adaptée au receveur. Permettre à chaque centre de prélèvement de choisir par défaut la solution de conservation qui lui semble la plus appropriée

Méthodologie : Etude observationnelle nationale multicentrique des patients transplantations hépatiques n ≥ 6000 entre le 1/1/2008 et le 9/12/2013, à partir des données de la base CRISTAL.

TABURET Anne-Marie : Nouveaux antiviraux à action directe : pharmacocinétique et interactions avec les immunosuppresseurs (cohorte ANRSCO23-CUPILT)

Objectifs

La cohorte ANRS CO23 CUPILT a pour objectif d'étudier la réponse virologique soutenue (SVR12) des nouveaux antiviraux à action directe (AAD) chez des patients transplantés hépatiques présentant une récurrence virale C chronique active. Parmi les objectifs secondaires, il est prévu d'étudier la

tolérance des AAD après transplantation hépatique et les interactions avec les immunosuppresseurs. Le présent projet s'inscrit dans une démarche de recherche de co financement pour compléter le financement de l'ANRS, puisque celui-ci ne finance que la mise en place et le fonctionnement de la cohorte, Les études ancillaires doivent-elles être financés par ailleurs.

Résultats attendus

Analyser l'évolution des concentrations d'anticalcineurine ou d'inhibiteur de la mTOR avant et après ajout des AAD et identifier les AAD entraînant potentiellement une modification des concentrations d'immunosuppresseurs.

Mesurer sur les prélèvements de la plasmathèque (collection biologique) les concentrations des AAD et +/- ribavirine et les comparer aux données historiques. Les concentrations seront analysées en fonction de la tolérance et de la survenue d'échec virologique. L'identification de modification de concentrations importantes pourrait conduire à la réalisation d'une étude pharmacocinétique plus complète pour identifier les facteurs conduisant à ces modifications.

Méthodologie.

- En coordination avec le centre de méthodologie de la cohorte, recueil des concentrations d'immunosuppresseurs mesurées sur site et analyse de la variation du rapport concentrations résiduelle/dose en fonction des AAD associés et de la fonction hépatique
- Mise au point des dosages des AAD par LC/MS/MS en collaboration avec l'équipe de pharmacologie de l'hôpital Saint-Louis (AP/HP) pour des raisons de disponibilité d'équipement
- Dosage des AAD sur les prélèvements conservés dans le cadre de la collection biologique constituée dans le cadre de la cohorte
- Analyse des résultats en fonction des caractéristiques clinico-biologiques des patients
- Si pertinent, construction d'un modèle de pharmacocinétique de population pour les nouveaux AAD les plus prescrits

TAUPIN Jean-Luc : Anticorps anti-HLA de classe II spécifiques du donneur d'organe : détection et rôle pathogène de HLA-DQ

Objectifs. L'immunisation de novo d'un receveur contre le donneur est plus fréquemment dirigée contre HLADQ, en transplantation rénale, cardiaque et pulmonaire. Dans un travail financé par l'ABM (AO 2013) et mené sur un groupe de 45 biopsies de greffon effectuées chez des greffés pulmonaires pour suspicion d'évènement immunologique, nous avons retrouvé ces anticorps anti-donneur (DSA) anti-DQ attachés au greffon, après élution selon la procédure décrite dans notre travail récent pour le rein (Bachelet et al, Am J Trans 2013). Les DSA anti-DQ sont donc pathogènes, alors que DQ est peu considéré dans l'allocation des greffons. De plus, peu d'informations sont disponibles sur l'expression et les effets médiés par HLA-DQ (hors présentation de peptides), la presque totalité des travaux faits sur la classe II se limitant à HLA-DR, considéré peut-être à tort comme représentatif. Pour étudier la molécule DQ dans le contexte d'une immunisation anti-DQ du receveur, nous proposons les objectifs spécifiques (OS) suivants :

OS1 : niveau d'expression membranaire (sur lymphocyte B, la cellule du crossmatch, et sur cellule endothéliale, la première cible des DSA du receveur)

OS2 : comparaison des crossmatchs en lymphocytotoxicité et cytométrie en flux, avec le test luminex « single antigen »

OS3 : mécanismes d'activation du complément, régulation membranaire et distribution membranaire de DQ

OS4 : affinité et concentration des DSA anti-DQ détectés dans le sérum et élués ou non de la biopsie

OS5 : impact du polymorphisme des deux chaînes de DQ sur les propriétés fonctionnelles des DSA anti-DQ (coopération entre épitopes cibles).

Les OS1 à 3 sont indépendants d'un organe et compareront HLA-DR, DQ et DP. Les OS4 et 5 cibleront DQ en greffe pulmonaire (sérums et biopsies).

Résultats attendus. Une expression inférieure, et peut-être une distribution membranaire différente, de DQ par rapport à DR et DP suggérerait des capacités fonctionnelles différentes de DQ notamment vis-à-vis du complément, et le besoin d'adapter l'interprétation des tests de crossmatch et de « single antigen » en fonction de l'antigène pour estimer le risque immunologique. Une affinité et/ou concentration pondérale plus élevée des DSA anti-DQ devrait favoriser leur liaison au greffon, donc la possibilité de les en éluer, expliquant leur pathogénicité élevée. Deux DSA différents dirigés contre des épitopes distincts du même antigène devraient disposer de fonctions biologiques exacerbées.

Méthodologie.

OS1 : cytométrie en flux de DR, DQ et DP sur cellules B (donneurs d'organe) et endothéliales de différents organes et tissus.

OS2 : étude rétrospective des crossmatch pré-greffe positifs expliqués par un seul DSA de classe II, identifiés au CHU de Bordeaux, et au Laboratoire d'histocompatibilité du CHU Saint-Louis.

OS3 : marquages membranaires sur cellules B et endothéliales des facteurs du complément (C1q, C3d, C4d), incubées avec des anti-classe II. Etude des régulateurs membranaires du complément (clivage enzymatique, rôle des microdomaines lipidiques), distribution membranaire (microscopie confocale)

OS4 et OS5 : résonance plasmonique de surface (Biacore) avec des molécules HLA-DQ purifiées.

THAUNAT Olivier : Prédiction du risque de rejet humoral en monitorant les lymphocytes T helper folliculaires circulants chez les transplantés rénaux

Les maladies rénales chroniques constituent à l'heure actuelle un problème de santé publique à l'échelle mondiale. La transplantation rénale représente l'option la plus attractive au stade terminal de l'insuffisance rénale, offrant une meilleure survie et une meilleure qualité de vie au patient pour un moindre coût pour la société. Au cours des dernières décennies, la demi-vie des greffons est restée stable. Prolonger la durée de vie des greffons apparaît donc comme une stratégie efficace pour lutter contre la pénurie d'organes actuelle.

Le rejet d'allogreffe résulte de la reconnaissance, par le système immunitaire du receveur, des antigènes spécifiques du donneurs (principalement des molécules HLA) exprimés par le greffon. Cette alloreconnaissance induit la génération d'effecteurs immunitaires cellulaires (Lymphocytes T (LT) CD8+ cytotoxiques) et/ou humoraux (anticorps anti-HLA) responsables de la destruction du greffon.

Pour prévenir le rejet, les receveurs doivent prendre des immunosuppresseurs qui agissent en bloquant l'activation lymphocytaires LT. Ces traitements ont permis de réduire drastiquement l'incidence des rejets cellulaires, leur impact sur la génération d'anticorps anti-donneur a été plus modeste. En conséquence, le rejet humoral est maintenant considéré comme la principale cause de perte des greffons. Cette situation est cependant surprenante au vu du dogme immunologique prévalent, qui prédit que le lymphocyte B ne peut répondre à un antigène protéique (tel que les molécules HLA du donneur) sans l'aide d'une sous-population de LT CD4+ : les LT helpers folliculaires (Tfh). Le blocage efficace des LT du receveur (comme en atteste la faible incidence de rejets cellulaires avec l'immunosuppression actuelle) aurait dû se traduire par une faible incidence de génération d'anticorps anti-donneur. Cette discordance suggère que les immunosuppresseurs ne contrôlent pas de manière efficace les Tfh.

Dans ce projet, nous profiterons du fait qu'il soit possible de détecter dans la circulation humaine de véritables Tfh pour monitorer cette population chez des transplantés rénaux sous immunosuppresseurs. 100 patients sans anticorps anti-HLA recevant une 1^{ère} transplantation rénale seront inclus prospectivement. Le nombre et la capacité d'activation de leurs Tfh circulants seront mesurés par cytométrie en flux à J0, 3 mois et 1 an post-transplantation.

Dans le présent projet, nous émettons l'hypothèse que la surveillance des Tfh circulants pourrait permettre d'identifier les transplantés rénaux à risque élevé de développer des anticorps anti-donneur. Ce nouveau biomarqueur non-invasif permettrait au clinicien d'adapter le traitement immunosuppresseur avant l'apparition des anticorps. Cette stratégie pourrait donc permettre la réduction de la survenue des rejets humoraux, ce qui pourrait se traduire par le prolongement de la demi-vie des greffons.

VILQUIN Jean-Thomas : Thérapie cellulaire cardiaque : capacités cardiogéniques de cellules progénitrices exprimant l'Aldéhyde Déhydrogénase

Contexte et objectifs : La thérapie cellulaire est développée en vue du traitement de certaines formes d'insuffisances cardiaques. Notre groupe a développé des expérimentations cliniques et/ou précliniques basées sur l'utilisation de myoblastes, puis de cellules souches embryonnaires, mais les résultats cliniques mitigés ont souligné à la fois les limitations intrinsèques des cellules étudiées, et le manque d'efficacité de certaines voies d'administration. Ces constats nous ont amenés à rechercher de nouvelles catégories de cellules progénitrices, et à élaborer de nouvelles stratégies de délivrance. Nous avons identifié une nouvelle population cellulaire au sein des tissus musculaires chez la Souris, le Singe, le Chien et l'Homme, sur la base de l'expression fonctionnelle de l'aldéhyde déhydrogénase (ALDH). Cette enzyme est un marqueur de cellules souches, elle détoxifie les aldéhydes en acides

carboxyliques et confère aux cellules de meilleures capacités de survie, et participe à la formation de l'acide rétinolique. Récemment, nous avons pu orienter les capacités de différenciation cardiaque de cellules ALDH+ in vitro et in vivo (après transplantation). Ces cellules, d'origine adulte, pourraient être utilisées selon un mode autologue. En parallèle, nous avons développé une méthodologie de préparation de feuillets cellulaires, à déposer sur la zone cardiaque à traiter. Nous proposons donc d'étudier une démarche d'ingénierie cellulaire à l'aide des cellules ALDH+ que nous avons identifiées. Nos objectifs sont d'évaluer et d'optimiser les rendements et capacités cardiogéniques des populations de cellules ALDH+ in vitro, d'abord dans des milieux dédiés puis sous forme de feuillets cellulaires, puis d'évaluer leur capacité à s'intégrer au tissu cardiaque dans des modèles animaux.

Méthodologies : Les cellules seront extraites de biopsies musculaires de Primates (Singes, Humains) et triées sur l'expression de l'ALDH. In vitro, la cinétique de la cardiogénèse sera analysée et optimisée dans des milieux dédiés. Les cellules seront caractérisées sur le plan phénotypique (cytométrie de flux), et moléculaire (RT-PCR) aux différents stades de la différenciation et de la production. Les cellules seront cultivées sur un support thermosensible permettant d'obtenir des feuillets détachables. In vivo, la cardiogénèse sera évaluée par dépôt éplicardique dans des souris immunodéficientes. L'explantation des coeurs permettra l'analyse immuno-histochimique de l'efficacité d'intégration tissulaire. Des contrôles cellulaires seront étudiés en parallèle (fraction cellulaire ALDH-, myoblastes squelettiques de culture primaire, cellules iPS induites).

Résultats attendus : Ce projet pourrait offrir une nouvelle population de progéniteurs, dont il est possible d'envisager une utilisation autologue. En perspective, des modèles animaux de plus grande taille (Chiens, Moutons) pourront être utilisés en vue de nouveaux développements cliniques.