

AOR "Recherche et Greffe"

Résumés et résultats

2006 - 2023

Cliquer sur les titres pour accéder au détail des projets

Nom et institution	Titre	Année AOR
BRUNIQUEL Denis - EFS Bretagne, RENNES	Induction de la tolérance contre la GVH aigüe chez l'homme après une greffe de cellules souches hématopoïétiques	2006
FARGE-BANCEL Dominique - INSERM U697 - Hôpital Saint-Louis	Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques versus Cyclophosphamide IV mensuel dans la sclérodémie systémique sévère.	2006
FLORENS Jean-Pierre - Université de Toulouse	Efficacité et valeur économique des registres de donneurs de cellules souches hématopoïétiques dans un contexte international.	2006
IVANOVIC Zoran - EFS-Bordeaux	Préservation fonctionnelle des cellules CD34+ à 4°C en hypoxie et hypercapnie	2006
JANIN Anne - Hôpital Saint-Louis, APHP	Apoptose endothéliale au cours des GVH: Mécanismes de lésion et réparation vasculaire, implications physiopathologiques.	2006
TARTE Karin - CHU de Rennes	Traitement préventif de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte par des cellules souches mésenchymateuses. Etude immunologique.	2006
BORG Christophe - EFS Bourgogne/Franche Comté	Etude de l'implication de CX3CR1 dans l'initiation des réactions du greffon contre l'hôte : Développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou sur la sélection des greffons pour favoriser la tolérance des allogreffes	2007
ROBINET Eric - EFS Bourgogne/Franche Comté	Amélioration de la reconstitution immunitaire post allogreffe hématopoïétique sans induction de Gvh par injection de cellules T cultivées	2007
TOUBERT Antoine - INSERM U662 - Saint-Louis - APHP	Thymus et fonctions régulatrices de cellules hématopoïétiques chez l'homme	2007
COHEN José - UPMC	Utilisation thérapeutique des Treg spécifiques dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques chez la souris	2008
GAUGLER Béatrice - EFS	Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides dans physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)	2008
VIEILLARD Vincent - Pitié-Salpêtrière - APHP	Reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire	2008

Nom et institution	Titre	Année AOR
BENSOUSSAN Danièle - CHU de Nancy	Production de lymphocytes T anti-adénovirus pour immunothérapie adoptive après alogreffe de CSh : protocole clinique	2009
IVANOVIC Zoran - EFS Aquitaine Limousin	Conservation à long et à court terme des cellules hématopoïétiques du sang placentaire après leur expansion ex vivo	2009
MOHTY Mohamad - Hématologie - CHU de Nantes	Evaluation à long terme des patients traités par alogreffe de cellules souches hématopoïétiques	2009
PIAGGIO Eliane - Pitié- Salpêtrière - APHP	Induction de tolérance In vivo via l'injection d'IL-2 : Potentiel thérapeutique dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte	2010
CANQUE Bruno - INSERM ADR 7	Optimisation de la recolonisation thymique après greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines	2011
GAGNE Katia - EFS Pays de Loire	Etude rétrospective et multicentrique de l'alloréactivité des cellules NK dans la prise de greffe de double sang de cordon	2011
GAUGLER Béatrice - EFS Bourgogne Franche Comté	Rôle de l'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte	2011
STERKERS Ghislaine - Robert Debré - APHP	Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pédiatrique	2011
CAILLAT-ZUCMAN Sophie - Robert Debré - APHP	Etude de la reconstitution des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) après alogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant	2012
ELBIM Carole - INSERM	Réponses fonctionnelles des Polynucléaires Neutrophiles vis-à-vis d'Aspergillus fumigatus chez les patients allogreffés de moelle osseuse	2012
EL-CHEIKH Jean - Institut Paoli Calmettes - Marseille	Etude pharmacocinétique du Busulfan dans le conditionnement d'une greffe allogénique chez des patients à haut risque porteurs d'hémopathies	2012
HERMINE Olivier - CNRS Paris	Rôle et mécanismes immunomodulateurs des NKT invariants humains après alogreffe de cellules souches hématopoïétiques	2012
IVANOVIC Zoran - EFS	Amélioration technique de l'expansion ex vivo des cellules hématopoïétiques de sang placentaire de grade clinique (utilisée pour le protocole de recherche clinique «GRAPA»)	2012
PERRUCHE Sylvain - EFS Besançon	Injection de cellules apoptotiques en alogreffe de cellules hématopoïétiques, du laboratoire au lit du patient	2012
RETIERE Christelle - EFS Pays de la Loire	Rôle anti-leucémique des cellules Natural Killer médié par les KIR activateurs	2012

Nom et institution	Titre	Année AOR
CHAPEROT Laurence - EFS	Mécanisme d'action et optimisation de l'Immunothérapie par Cellules Modifiées par Photochimie (ICMP)	2013
DI CRISTOFARO Julie - Université Aix-Marseille	Personnes issues de l'immigration à Marseille et Enrichissement de la banque de sang placentaire	2013
GOODHARDT Michele - Université Paris Diderot	Biomarqueurs épigénétique en greffe de cellules souches hématopoïétiques : implication dans les complications post-greffe	2013
MALLONE Roberto - INSERM	Une thérapie cellulaire T adoptive dans la greffe des cellules hématopoïétiques souche de sang placentaire	2013
BENSOUSSAN Danièle - CHU de Nancy	Production de lymphocytes T anti-virus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSH : protocole clinique	2014
GAGNE Katia - EFS Pays de la Loire	Potentiel anti-leucémique des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon. Application en double-greffe de sang de cordon	2014
MOREAU-GAUDRY François - Université de Bordeaux	Optimisation et sécurisation de la greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir d'iPSCs humaines	2014
CANQUE Bruno - UMR Inserm/UPVII/EPHE 1126 - Saint-Louis -APHP	Cartographie développementale du système immunitaire humain : implications pour la prise en charge des patients allogreffés	2015
D'AVENI Maud - UTCT - CHU de Nancy	Ingénierie cellulaire par les cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton dans la réaction du greffon contre l'hôte	2015
GUILLONEAU Carole - ITUN - INSERM U1064 - CHU de Nantes	Nouvelle immunothérapie tolérogène dans le traitement du rejet de greffe de cœur et la GVHD aigüe	2015
IVANOVIC Zoran - EFS Bordeaux	Réalisation des greffons hématopoïétiques à partir de cellules CD34+ récupérées par cytophérèse sans mobilisation et amplifiées ex vivo	2015
LAUNAY David - EA2686 - Immunologie - Lille	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	2015
ROBIN Marie - Hématologie - Saint-Louis - APHP	Impact du ruxolitinib sur les profils immunitaires et hématologiques pré-allogreffe de moelle et post allogreffe de moelle chez les patients atteints de myélofibrose	2015
CANQUE Bruno - INSERM/UPVII/EPHE 1126 Hôpital Saint-Louis	Aspects épigénétiques du développement hématopoïétique dans l'espèce humaine	2017
MOREAU-GAUDRY François - INSERM U1035, Bordeaux	Greffes de cellules souches hématopoïétiques dérivées d'iPSCs humaines	2017

Nom et institution	Titre	Année AOR
LOUDIN Claire - EA 3279 - Marseille	Incidence et description de la GvH chronique dans la population d'enfants et adolescents greffés inclus dans la cohorte LEA	2017
BRUNET DE LA GRANGE Philippe - BMGIC - INSERM U1035	Signature génique et métabolique des cellules souches hématopoïétiques cultivées à basses concentrations d'oxygène	2018
HERMINE Olivier - Institut Imagine	Etude du rôle physiologique de la sérotonine dans l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques	2018
RETIERE Christelle - INSERM U1232 - CHU d'Angers	Bases immunogénétiques et phénotypiques d'identification des cellules NK impliquées dans l'effet antileucémique	2018
ROUARD Helene - INSERM U955 – APHP	Stockage cryogénique des greffons de cellules souches hématopoïétiques et maîtrise du risque	2018
CANQUE Bruno - Hématologie - Saint-Louis - APHP	Reconstitution de l'immunité humorale après transplantation de moelle osseuse	2019
DEPIL Stéphane - CRCL - Lyon	Etude des rétrovirus endogènes humains après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques: expression et impact immunitaire	2019
ZUBER Julien - INSERM UMR_S 1163 - Institut Imagine	Ingénierie de cellules T régulatrices par récepteur chimérique spécifique du donneur en transplantation allogénique	2019
BERNAUDIN Françoise - CHI de Créteil	Comparaison à long-terme de l'évolution de la vasculopathie cérébrale après greffe vs traitement standard chez les enfants drépanocytaires	2020
IRLA Magali - CIML - Marseille	Thérapie cellulaire basée sur des Treg déficients pour le gène lymphotoxine α pour prévenir de GVHD	2021
SAULTIER Paul - Hématologie - APHM	Etat de santé à long terme après greffe de cellules souches hématopoïétiques dans l'enfance pour hémopathie maligne hors leucémie aiguë (SEGOLEN)	2021
FORCADE Edouard - Immunoconcept - UMR CNRS 5164 - Bordeaux	Organisation lymphoïde tertiaire au cours de la GVH chronique	2022
GALAINNE Jeanne - UMR1098 RIGHT - Besançon	Reprogrammation des cellules de sang placentaire pour le développement de thérapies cellulaires antitumorales allogéniques	2022
GUITART Amélie - INSERM U1035, Bordeaux	Métabolisme des cellules souches hématopoïétique au cours de l'autorenouveaulement	2022
BOUAZIZ Jean David - INSERM U976 Hopital saint Louis	Évaluation d'un ciblage d'IFNAR dans le traitement du lichen plan compliquant la greffe de cellule souche hématopoïétique	2023

Nom et institution	Titre	Année AOR
GAGNE Katia - CRCI2NA - Nantes	Impact des polymorphismes des gènes KIR, HLA de classe I classiques et non-classiques sur le devenir des greffes de CSH haplo-identiques (étude multicentrique POLKA)	2023
PEFFAULT DE LATOUR Régis - Hématologie - Saint-Louis - APHP	Evaluation d'impact de NewSpringForMe, première solution digitale d'accompagnement du patient allogreffé (moelle osseuse ou cellules souches hématopoïétiques)	2023
ROUZAIRE Paul - EA(UR) CHELTER 7453 Université Clermont-Auvergne	NUTRIREG-T cells : expression contrôlée d'un gène thérapeutique dans les lymphocytes T pour une utilisation en immunothérapie cellulaire	2023

Année: 2006

Induction de la tolérance contre la GVH aigüe chez l'homme après une greffe de cellules souches hématopoïétiques

BRUNIQUEL Denis - EFS Bretagne, RENNES

[Retour tableau](#)

Résumé

Une des complications majeures de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Il a été montré, dans des modèles murins, que des lymphocytes T régulateurs (LTR) interviennent dans le contrôle de la GVH. Le premier objectif de l'étude que nous proposons est de démontrer que la population de LTR définie par la co-expression des molécules CD4, CD25 et CTLA-4 est impliquée dans la protection du patient contre le développement de la GVH. D'ores et déjà, nous conduisons une analyse prospective par cytométrie du compartiment des LTR dans le greffon ainsi qu'au cours de la reconstitution hématopoïétique au cours des 30 premiers jours suivant l'allogreffe (PHRC 2003 + Subvention Agence de la biomédecine 2005). En complément nous nous proposons dans ce projet de déterminer l'origine de ces LTR, par chimérisme. Notre hypothèse est qu'en fonction de cette origine, le LTR provenant du donneur ou du receveur vont avoir des effets très différents sur l'induction de la tolérance du greffon après une greffe hématopoïétique allogénique. Aussi, nous nous attacherons à étudier la fonctionnalité de ces LTR dans les différents compartiments, le greffon d'une part et le sang périphérique post-greffe à J30 que ces LTR soient d'origine donneur ou receveur. L'état d'activation du LTR jouant probablement un rôle dans la protection contre la GVH, cette partie sera effectuée à l'aide d'un test fonctionnel mis au point dans le laboratoire. Cette étude permettra de corréler la présence des LTR, leurs origines et leur fonctionnalité à la protection contre la GVH. En fonction des résultats obtenus, l'utilisation de LTR du donneur ou du receveur comme outil thérapeutique pourrait être envisagée à l'avenir pour traiter la GVH.

Résultats

Noël, G., D. Bruniquel, B. Birebent, S. DeGuibert, J.-M. Grosset, M. Bernard, C. Dauriac, et al. 2008. « Patients Suffering from Acute Graft-versus-Host Disease after Bone-Marrow Transplantation Have Functional CD4+CD25hiFoxp3+ Regulatory T Cells ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 129 (2): 241-48.

Noël, Grégory, Denis Bruniquel, Sophie DeGuibert, Brigitte Birebent, Jean-Marc Grosset, Marc Bernard, Charlie Dauriac, Thierry Lamy-de-la-Chapelle, Gilbert Semana, et Carine Brinster. 2008. « Regulatory CD4+CD25hi T Cells Conserve Their Function and Phenotype after Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment in Human Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Human Immunology* 69 (6): 329-37.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques périphériques versus Cyclophosphamide IV mensuel dans la sclérodémie systémique sévère.

FARGE-BANCEL Dominique - Hôpital Saint-Louis, INSERM U697 PARIS

[Retour tableau](#)

Résumé

Afin d'analyser l'efficacité et la toxicité du traitement par autogreffe de moelle au cours de la sclérodémie systémique sévère et les mécanismes des réponses observées après traitement, nous proposons l'étude suivante :

1° Poursuivre la participation du Groupe français, initié depuis 2001 dans le cadre d'un financement résiduel du PHRC 1997 (crédit AOM 97030), à l'étude européenne multicentrique « ASTIS » : Autologous Stem Cell Transplantation International Scleroderma Trial en proposant l'inclusion de 20 malades supplémentaires recrutés et traités sur l'ensemble de la France (y compris les DOM-TOM) en 3 ans dans le cadre de l'essai européen ASTIS, étude contrôlée de phase III prospective randomisée et multicentrique européennes qui devra inclure 100 patients dans chaque bras :

- Pour comparer l'efficacité et la toxicité : * d'une intensification thérapeutique (bras étudié) à forte dose après mobilisation des cellules souches hématopoïétiques périphériques (CSHP) par du cyclophosphamide intraveineux ($2g \times 2/m^2$) et du filgrastim $10\mu/kg/jour$ suivi d'une sélection positive CD34+ puis d'un conditionnement 6 semaines plus tard par cyclophosphamide i.v. (200mg/kg dose totale) et globulines antithymocytaires de lapin (7.5mg/kg) suivi de l'autogreffe des CHSP prélevées, * au traitement de référence (bas contrôle) reposant sur 12 bolus mensuels de cyclophosphamide i.v. ($750mg/m^2$)

- et dont le critère principal de jugement est la durée de survie sans évènement, définie par le temps entre le jour de la randomisation et le décès ou l'apparition d'une défaillance viscérale : cardiaque, pulmonaire, ou rénale majeure persistante, sur une période d'étude deux ans.

2° Evaluer si la réponse clinique observée chez les patients traités (autogreffe et cyclo i.v.) est corrélée à l'analyse de la reconstitution immunologique et de la réponse histologique par deux études ancillaires conduites à l'échelon français qui analyseront plus spécifiquement : 2a) les déterminants immunologiques de la réponse observée par l'étude de la reconstitution immunitaire par immuno-marquage. 2b) si la réponse clinique observée est corrélée à des modifications des signaux profibrosants liés au TGF β au niveau des lésions cutanées, par étude des biopsies cutanées prélevées dans les zones cliniquement atteintes avant le début du traitement et 6 mois après la période où l'amélioration clinique devient appréciable.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Effacité et valeur économique des registres de donneurs de cellules souches hématopoïétiques dans un contexte international.

FLORENS Jean-Pierre - Université Toulouse 1, TOULOUSE

[Retour tableau](#)

Résumé

Développer un outil d'aide à la décision basé sur un modèle mathématique permettant : i) d'examiner l'impact du choix de la précision du typage des donneurs de CSH sur l'efficacité des registres ; ii) d'insérer le registre national dans un ensemble de registres nationaux interconnectés (en incluant l'aide au développement d'un registre dans un pays afin en particulier d'accroître les chances de trouver un donneur pour des patients des minorités françaises) ; iii) d'analyser l'optimisation conjointe du registre de donneurs de QCSH et de la banque de sang placentaire, en relation avec les possibilités de compatibilité partielle.

Résultats attendus : une amélioration de l'efficacité des registres correspondant à un typage HLA précis, une optimisation du système en cas d'interconnexion efficace des registres et une utilisation alternative réaliste de la banque de sang de cordon.

Méthodologie : on utilise le calcul économie pour modéliser l'organisation de la filière du don de CSH en vue de greffes. On propose une mesure d'efficacité d'un registre de donneurs volontaires. Le modèle montre que certains éléments clé du fonctionnement d'un registre peuvent être évalués à partir d'arguments statistiques (nombre et distribution de types HLA en France), d'autres peuvent évoluer en fonction de la politique de l'Agence de la biomédecine et d'autres enfin relèvent d'une évaluation plus complexe liée au bénéfice attendu d'une greffe.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Préservation fonctionnelle des cellules CD34+ à 4°C en hypoxie et hypercapnie

IVANOVIC Zoran - EFS Aquitaine limousin, BORDEAUX

[Retour tableau](#)

Résumé

Le projet présenté ici a pour objectif d'améliorer la conservation des cellules CD34+ à + 4°C sans congélation. L'originalité de notre approche consiste à associer les effets d'une basse concentration en oxygène (O₂ ; hypoxie) avec une concentration élevée de dioxyde de carbone (Co₂, hypercapnie), pour préserver ces cellules à basse température. Nos travaux préliminaires ayant donné des résultats positifs, nous proposons maintenant d'explorer les effets de plusieurs concentrations de CO₂ et d'O₂. Afin de trouver des valeurs optimales pour conserver les progénitures clonogéniques et les cellules souches hématopoïétiques en milieu liquide pendant une ou deux semaines, voire plus longtemps, nos objectifs immédiats seront :

d'explorer le maintien des cellules CD34+ et des progéniteurs hématopoïétiques à des concentrations de CO₂ de 0.25, 5 et 7 %, croisées avec des concentrations d'O₂ de 0.5, 3.5 et 20 % ; d'étudier l'effet sur la conservation d'un ajout d'IL-3 (laboratoire de Z. Ivanovic) et de VEGF (laboratoire de V. Praloran) ; de choisir les meilleures conditions et de vérifier le maintien des cellules souches hématopoïétiques par une greffe en série aux souris NOD/SCID ; de prolonger la conservation à 10 et 14 jours. Ceci est le préalable à la poursuite de ces travaux avec deux objectifs futurs : 1/ développement de techniques de conservations des cellules CD34+ sans congélation, potentiellement applicables à d'autres types de cellules utilisables en thérapie cellulaire. 2/ sélection d'un petit nombre de conditions permettant une étude des modifications du métabolisme cellulaire responsables de l'adaptation à l'hypothermie des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.

Résultats attendus : Nos résultats préliminaires ont confirmé notre hypothèse que l'hypoxie associée à une hypercapnie modérée préserve mieux les cellules CD34+ primitives à + 4 °C (en hypothermie). La probabilité d'amélioration de cette technique par la recherche des concentrations optimales d'O₂ et de CO₂ est forte. Ce travail devrait permettre de définir des conditions de conservation des cellules CD34+ sans congélation, au-delà d'une semaine, ce qui est impossible aujourd'hui. Si c'est le cas, les retombées pratiques de ce travail seront importantes. D'un point de vue fondamental, ces conditions de conservation permettront d'étudier les mécanismes de cette adaptation spécifique des cellules souches à l'hypothermie.

Méthodologie : les cellules CD34+ provenant de sangs placentaires, isolées par tri immuno-magnétique (technologies Miltenyi et Stem Cells Technology) seront conservées à +4°C dans un mélange gazeux hypoxique/hypercapnique (16 combinaisons de concentration CO₂/O₂ seront étudiées) ; le milieu de conservation Stem Alpha S3 sera utilisée soit sans cytokine (2 équipes participantes), soit avec IL-3 (équipe de Z. Ivanovic) ou VEGF (équipe de V. Praloran) ; les progéniteurs hématopoïétiques sont mis en évidence par culture en métylcellulose préfabriquée (Stem Alpha 1D). ; Les cellules souches hématopoïétiques seront étudiées par leur capacité de greffe « en série » (2 générations de receveurs) à des souris NOD/SCID. ; Le cycle cellulaire sera étudié par cytométrie en flux (K167/IP), l'évolution de l'apoptose (AnnV/IP) et la prolifération à 7, 10 et 14 jours (PKH26/PKH2) de ces cellules seront étudiées par cytométrie en flux.

Résultats

Jeanne, Michel, Milica Kovacevic-Filipovic, Milène Szyporta, Marija Vlaski, Francis Hermitte, Xavier Lafarge, Pascale Duchez, Jean-Michel Boiron, Vincent Praloran, et Zoran Ivanovic. 2009. « Low-Oxygen

and High-Carbon-Dioxide Atmosphere Improves the Conservation of Hematopoietic Progenitors in Hypothermia ». *Transfusion* 49 (8): 1738-46.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Apoptose endothéliale au cours des GVH: Mécanismes de lésion et réparation vasculaire, implications physiopathologiques.

JANIN Anne - Hôpital Saint-Louis, 75010 PARIS

[Retour tableau](#)

Résumé

La maladie du greffon contre l'hôte ou GVH est la complication majeure des greffes allogéniques de cellules souches hématopoïétiques, mais elle a un effet bénéfique anti tumoral, graft versus lymphoma ou GVL. Nous avons montré dans un modèle murin que les cellules endothéliales de tous les organes y compris le cœur sont une cible précoce de la GVH et qu'elles sont détruites par un mécanisme d'apoptose induit par le FasL exprimé par les lymphocytes allogéniques. Ces lésions vasculaires étaient prévenues par l'injection d'inhibiteurs des caspases, ou de basic FGF (bFGF), un facteur de croissance, élément de survie des cellules endothéliales. L'existence de lésions vasculaires chez l'homme a été confirmée dans les GVH chroniques cutanées, et par notre étude montrant des lésions vasculaires corrélées à la sévérité des GVH aiguës digestives. Ces données sont importantes car seules des cellules épithéliales (foie, peau, intestin) étaient jusque là reconnues comme cibles de la GVH. Elles ouvrent un champ d'investigation nouveau que nous voulons explorer dans notre modèle murin et valider sur des prélèvements humains. Nos objectifs sont :

1/ Déterminer la cinétique d'apparition des lésions endothéliales et endocardiaques, leur degré de sévérité, leur impact sur les cellules de voisinage (épithélium, cellules myocardiques) et préciser la nature moléculaire des mécanismes effecteurs des GVH, et leur participation respective à l'induction de lésions endothéliales. En associant immunomarquage et ultrastructure, puis microdissection laser et analyses moléculaires, nous explorerons si les lésions induites par la GVH affectent uniquement l'endothélium quel que soit l'organe et/ou le type vasculaire, et si le seuil de déclenchement de l'apoptose varie selon le territoire vasculaire. Ces études seront réalisées en transférant des lymphocytes allogéniques de souris déficientes en effecteurs des voies de cytotoxicité (CD95L ou CD95) et en traitant les souris receveuses par inhibiteurs de caspases ou bFGF. 2/ Définir l'origine (donneur/receveur) de cellules impliquées dans la réparation endothéliale et caractériser la nature des cellules chimériques. Des travaux récents sur la plasticité des cellules souches ont établi que des cellules endothéliales chimériques sont présentes après greffes de cellules souches hématopoïétiques. Pour cette étude, la détection des cellules chimériques se fera en combinant marquage X et Y par la méthode de FISH, et double immunomarquage endothélial et lymphocytaire sur un modèle de greffe de moelle en utilisant des souris de sexe différent comme donneurs et receveurs. Ce projet scientifique fédère autour de la physiopathologie des GVH trois équipes distinctes aux objectifs et compétences complémentaires. La complémentarité entre équipes inclut au premier rang les thèmes de recherches mais aussi l'expertise scientifique et l'exploitation de matériel biologique. Les techniques innovantes qui sont indispensables à la réalisation du projet font l'objet d'un partenariat industriel déjà mis en place par l'équipe d'A. Janin. Les résultats attendus de ce programme multidisciplinaire sont de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des lésions de GVH, de déterminer et de comparer les sensibilités endothéliales à l'apoptose induite par les greffes dans différents organes, et d'apprécier l'impact des thérapies cellulaires dans la réparation vasculaire aussi bien dans le domaine onco-hématologique que cardiologique.

Résultats

Janin, A., H. Murata, C. Leboeuf, J.-M. Cayuela, E. Gluckman, L. Legres, A. Desveaux, et al. 2009. « Donor-Derived Oral Squamous Cell Carcinoma after Allogeneic Bone Marrow Transplantation ». *Blood* 113 (8): 1834-40.

Murata, Hideyuki, Philippe Ratajczak, Véronique Meignin, Odile Groussard, Michel Fournier, Gérard Socié, Hervé Mal, et Anne Janin. 2008. « Endothelial cell chimerism associated with graft rejection after human lung transplantation ». *Transplantation* 85 (1): 150–154.

Ratajczak, Philippe, Anne Janin, Régis Peffault De Latour, Christophe Leboeuf, Allison Desveaux, Keyvan Keyvanfar, Marie Robin, et al. 2010. « Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease ». *Blood* 116 (7): 1165–1171.

Ratajczak, Philippe, Anne Janin, Régis Peffault de Larour, Lisa Koch, Brigitte Roche, David Munn, Bruce R. Blazar, et Gérard Socié. 2012. « IDO in Human Gut Graft-versus-Host Disease ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 18 (1): 150-55.

[Retour tableau](#)

Année: 2006

Traitement préventif de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte par des cellules souches mésenchymateuses. Etude immunologique.

TARTE Karin - CHU Pontchaillou, RENNES

[Retour tableau](#)

Résumé

Le projet MESENCHYMMUNO a pour objectif d'assurer un suivi immunologique optimal du protocole clinique multicentrique randomisé intitulé Traitement préventif de la réaction aigüe du greffon contre l'hôte post allogreffe de cellules souches hématopoïétiques par des cellules souches mésenchymateuses, qui inclura 74 patients sur

19 centres greffeurs français. Cet essai, placé sous l'égide de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) sera le premier utilisant à large échelle dans une étude en double aveugle les propriétés immunorégulatrices des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour prévenir la GVH, dans un contexte d'allogreffe à conditionnement myéloablatif. Les trois questions posées ici sont i) la persistance des CSM du donneur in vivo, qui sera évalué par quantification du chimérisme mésenchymateux par PCR sur cultures de CSM médullaires à J90 et J360 post-greffe ; ii) l'effet immunologique des CSM injectées et des CSM persistant in vivo, que nous étudierons par des expériences de co-cultures des CSM avec des lymphocytes T activés et par le dosage de l'activité d'IDO, une enzyme importante pour l'effet immunorégulateur des CSM ; iii) et l'impact des CSM sur la qualité de la reconstitution immunologique post-greffe par un phénotype des sous-populations T, B, dendritiques, NK et monocytaire, une évaluation de la part relative de l'expansion périphérique et du thymus dans la reconstitution T (quantification des TREC) et une évaluation de la fonctionnalité lymphocytaire (étude de la prolifération T, dosage d'anticorps spécifiques). Les plateformes de Rennes, Grenoble et Besançon, impliquées dans l'immunologie des greffes, la compréhension de la biologie des CSM et l'étude du chimérisme se sont associées pour mener à bien ce travail et harmoniser mes différentes évaluations de façon fiable et coordonnée. Au final, le projet devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des CSM, d'évaluer les conséquences de leur injection au plan immunologique, d'analyser les paramètres influençant la réponse clinique au traitement et donc d'améliorer les conditions d'utilisation des CSM pour de futurs programmes thérapeutiques.

Résultats

Tarte, Karin, Julien Gaillard, Jean-Jacques Lataillade, Loic Fouillard, Martine Becker, Hossein Mossafa, Andrei Tchirkov, et al. 2010. « Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation ». Blood 115 (8): 1549–1553.

[Retour tableau](#)

Année: 2007

Etude de l'implication de CX3CR1 dans l'initiation des réactions du greffon contre l'hôte : Développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou sur la sélection des greffons pour favoriser la tolérance des allogreffes

BORG Christophe - EFS Bourgogne/Franche Comté

[Retour tableau](#)

Résumé

Le contrôle des interactions entre les cellules immunitaires initiant les réponses allogéniques est un enjeu majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques favorisant la tolérance des procédures de transplantation. Nous avons identifié la voie CX3CL1/CX3CR1 comme un élément important dans la genèse des réponses alloréactives et proposons un programme de recherche intégré ayant pour objectif (i) la description des mécanismes impliquant cette voie dans les réponses allogéniques, (ii) le développement d'outils thérapeutiques basés sur ces travaux. Plusieurs souspopulations de lymphocytes T CD4, CD8 et NK expriment le récepteur de la fractalkine CX3CR1. La fractalkine CX3CL1 est une chémokine particulière dont l'expression peut être membranaire et dont le spectre des activités biologiques est large. CX3CL1 est impliquée dans des processus de chimiotactisme, d'adhérence, d'orientation des réponses immunitaires vers un profil TH1. De plus, CX3CL1 est produite par des cellules impliquées de manière majeure dans l'initiation des réponses inflammatoires et immunitaires, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales activées. Ainsi, de récents travaux confirment l'influence de CX3CL1 dans le développement de maladies inflammatoires et dans l'athérosclérose. Nous souhaitons définir le rôle de CX3CL1/CX3CR1 dans l'initiation des GvH aiguës. Ainsi, nous étudierons si des lymphocytes allogéniques déficient en CX3CR1 peuvent induire une réaction du greffon contre l'hôte aiguë, dans des modèles murins d'allogreffe de cellules hématopoïétiques. Nous déterminerons quels sont les mécanismes initiateurs de la GvH qui dépendent de CX3CR1 (maturation des cellules dendritiques, prolifération des lymphocytes T CD4 et augmentation des fonctions auxiliaires TH1 ou augmentation des fonctions effectrices des lymphocytes T CD8). Dans un second temps, nous analyserons les polymorphismes de CX3CR1 dans une cohorte de donneurs de cellules hématopoïétiques utilisées pour des allogreffes. Nous déterminerons s'il existe une liaison entre les polymorphismes défavorables à l'association CX3CL1/CX3CR1 et l'incidence des GvH après allogreffe de cellules hématopoïétiques. Ces données seront reproduites dans un autre modèle ou cette analyse génétique pourrait avoir un intérêt thérapeutique : la transplantation rénale. Nous envisagerons le développement de plusieurs approches thérapeutiques en s'appuyant sur les compétences de notre centre d'investigation clinique en biothérapie et des réseaux nationaux, particulièrement :

- Un protocole de sélection des greffons allogéniques basé sur l'analyse des polymorphismes de CX3CR1 (service d'hématologie du CHU de Besançon, SFGM).
- Un protocole en transplantation rénale modulant l'intensité de l'immunosuppression en fonction des polymorphismes de CX3CR1, portés par le receveur.
- Nous produirons également des anticorps monoclonaux contre CX3CL1 et CX3CR1 dont nous évaluerons la bioactivité et l'intérêt thérapeutique en collaboration avec la société Diaclone.

[Retour tableau](#)

[Etude de l'implication de CX3CR1 dans l'initiation des réactions du greffon contre l'hôte : Développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou sur la sélection des greffons pour favoriser la tolérance des allogreffes](#) **Année: 2007**

Amélioration de la reconstitution immunitaire post allogreffe hématopoïétique sans induction de GvH par injection de cellules T cultivées

ROBINET Eric - EFS Bourgogne/Franche Comté

[Retour tableau](#)

Résumé

Plusieurs développements récents ont permis d'élargir les indications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : en réduisant la toxicité du conditionnement, les conditionnements non myéloablatifs ont permis d'appliquer l'allogreffe de CSH à des patients âgés ou de nouvelles pathologies. Les limitations dues à la disponibilité réduite de donneurs intra-familiaux ont été contournées par le développement des greffes haplo-identiques et surtout par l'utilisation du sang de cordon comme source de CSH alternative à la moelle ou aux cellules souches périphériques. Cependant, ces deux types de greffe sont associés à une moins bonne reconstitution immunitaire, conduisant à un risque infectieux accru. De plus, l'obtention d'une modulation efficace de l'alloréactivité après greffe de CSH allogéniques en fonction du risque de rejet de greffe, de réaction du greffon contre l'hôte (GvH) et de rechute leucémique reste un objectif prioritaire pour les équipes de greffe. Dans cette optique, nous avons réalisé une étude de thérapie génique qui a démontré la possibilité de contrôler l'alloréactivité par transfert d'un gène de toxicité conditionnelle dans les cellules T du donneur, en présence d'une bonne reconstitution immunitaire. Cependant, nous avons montré que la culture ex vivo nécessaire au transfert de gène s'accompagnait d'une diminution d'alloréactivité des cellules génétiquement modifiées, se traduisant par une capacité diminuée, voire absente, à induire une GvH dans des modèles murins d'allogreffe de CSH. Nos résultats préliminaires montrent que ce phénomène ne s'accompagne pas d'une perte de l'effet bénéfique des cellules T sur la reconstitution. En effet, l'administration de cellules T du donneur cultivées ex vivo accélère la reconstitution immunitaire par les cellules T issues du greffon médullaire et non à une expansion périphérique des cellules T cultivées administrées lors de la greffe. Notre projet a deux objectifs :

(1) Appréhender les effets bénéfiques des cellules T cultivées ex vivo non alloréactives sur la reconstitution immunitaire et évaluer la faisabilité d'utiliser ces cellules comme approche originale de thérapie cellulaire destinée à améliorer la reconstitution immunitaire, notamment dans le cadre de greffes T-déplétées chez les patients âgés ou de greffes haplo-identiques ou de sang de cordon. Nous nous intéresserons ainsi aux origines (donneur, receveur, tierce partie), phénotypes (CD4 vs CD8, naïfs vs mémoires) et doses possibles des cellules T cultivées impliquées.

(2) Etudier les mécanismes impliqués, en posant deux hypothèses : (a) les effets bénéfiques des cellules cultivées sur la reconstitution immunitaire nécessitent une activation des cellules T administrées par reconnaissance des alloantigènes du receveur. Les mécanismes explorés porteront notamment sur l'implication d'une cytotoxicité anti-receveur ou la différenciation en cellules régulatrices. La simple mise en culture de cellules T allogéniques pourrait donc se révéler être une approche originale permettant de dissocier les effets néfastes des effets bénéfiques des cellules T alloréactives. (b) la culture ex vivo permet d'acquérir un potentiel d'amélioration de la reconstitution immunitaire indépendamment de l'alloréactivité anti-receveur des cellules cultivées. Les mécanismes explorés porteront sur l'implication de facteurs solubles (IL-7, IL-15 ou autres candidats, identifiés sur la base d'une analyse transcriptomique réalisée dans notre unité) ou de protéines Hedgehog dans la différenciation des cellules T.

[Retour tableau](#)

Année: 2007

Thymus et fonctions régulatrices de cellules hématopoïétiques chez l'homme

TOUBERT Antoine - INSERM U662

Hopital Saint-Louis

[Retour tableau](#)

Résumé

Objectifs : Le thymus joue un rôle crucial dans la reconstitution lymphocytaire T après allogreffe de cellules hématopoïétiques (CSH). Il peut être une cible de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) et sa fonction altérée au cours de la GVH aiguë et chronique. Par ailleurs, nous avons montré (Clave et al., Blood, 2005) l'influence de la fonction thymique du receveur avant greffe sur les événements suivant la greffe (survie, GVH, infections sévères). Ceci suggère que la fonction thymique est un paramètre important dans la qualité de la reconstitution immunitaire post-allogreffe. Le projet a pour objectif de:

- Corréler la fonction thymique pré et post greffe avec la reconstitution immunitaire des populations lymphocytaires T régulatrices (Treg) CD4+CD25^{high} qui pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la GVH et sont produites dans le thymus pour les Treg dits « naturels ».
- Préciser les mécanismes de l'atteinte thymique au cours de la GVH et son impact sur la production de lymphocytes Treg.
- Corréler les paramètres précédents avec des données immunopathologiques concernant l'infiltrat lymphocytaire des lésions de GVH digestive.

Résultats attendus

- Une amélioration du suivi immunologique des patients après allogreffe de CSH par une meilleure compréhension des mécanismes de la reconstitution immunitaire T et du rôle de la fonction thymique.
- L'effet d'altérations persistantes de la fonction thymique sur le développement ultérieur d'une GVH chronique après une GVH aiguë sera en particulier analysé.
- A plus long terme, ces données pourraient justifier des approches visant à améliorer la fonction thymique au cours des allogreffes de CSH (IL-7, KGF).

Méthodologies

- Nous disposons d'échantillons (cellules mononuclées congelées après séparation sur Ficoll, DNA et RNA) de couples donneur/receveur avant greffe et en suivi à 3, 6, 12 mois après greffe. Ceux-ci ont été collectés de façon prospective dans le cadre d'un programme d'évaluation de la reconstitution immunitaire après allogreffe (PHRC AOM 97093).
- Les approches combineront une analyse phénotypique de la reconstitution immunitaire T, la quantification de la fonction thymique (TREC) et la mesure du taux d'expression du facteur FOXP3 par RT-PCR quantitative et cytométrie intracellulaire. Une technique innovante permettant d'évaluer la prolifération des précurseurs lymphoïdes intrathymique est développée (test « bêta TREC »). La diversité du répertoire T sera étudiée par PCR quantitative des différentes familles V et par Immunoscope.
- Cette étude sera couplée avec une étude in situ à partir de biopsies de patients atteints de GVH pour évaluer la présence de lymphocytes Treg au sein de l'infiltrat par marquage immunoenzymatique.

L'analyse statistique sera conduite à la recherche de corrélations avec les événements post-greffe (survie, GVH aiguë et chronique, infections sévères) à l'aide de méthodes statistiques univariées et multivariées.

Résultats

Clave, Emmanuel, Marc Busson, Corinne Douay, Régis Peffault de Latour, Jeannig Berrou, Claire Rabian, Maryvonnick Carmagnat, et al. 2009. « Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation ». *Blood* 113 (25): 6477–6484.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

Utilisation thérapeutique des Treg spécifiques dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques chez la souris

COHEN José - Université Pierre et Marie Curie

[Retour tableau](#)

Résumé

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogénique est l'une des approches thérapeutiques principales pour la reconstitution hématopoïétique de patients atteints d'aplasie médullaire, de déficits immunitaires ou de leucémies. Dans ce dernier cas, l'efficacité de la greffe de CSH allogénique repose à la fois sur la myéloablation induite par le conditionnement et sur le transfert de lymphocytes T (Ly T) du donneur présents au sein du greffon qui exercent (i) un effet antileucémique ou graft versus leukemia (GVL), (ii) une facilitation de la prise de greffe et (iii) contribuent à la reconstitution immunitaire du patient. Toutefois, cette action bénéfique des Ly T est contrebalancée par le risque de maladie du greffon contre l'hôte (GVH), principale cause de décès post-greffe. Cette GVH est liée à la reconnaissance par les Ly T du donneur, d'antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité présentés par les cellules du receveur. En 1995, le groupe de Shimon Sakaguchi au Japon a identifié les Ly T CD4+CD25+ immunosuppresseurs (Treg) dans le champ de l'auto-immunité. Nos travaux pionniers ont permis de montrer que l'élimination des Treg naturellement présents dans le greffon médullaire aggrave fortement la GVH, alors qu'au contraire, lorsque le greffon contient un grand nombre de Treg et plus particulièrement des Treg spécifiques pour les antigènes du futur receveur, la GVH est contrôlée. Ce projet repose sur deux objectifs.

1) Sur un plan préclinique : définir la participation des Ly T du donneur présents dans le greffon sur la reconstitution immunitaire post-greffe après contrôle de la GVH par les Treg spécifiques. On sait que ce sont ces LyT du greffon qui portent la reconstitution immunitaire post-greffe du fait de l'involution thymique chez l'homme adulte.

2) Sur un plan fondamental, étudier la possibilité d'utiliser des Treg spécifiques d'antigènes «non allogéniques » pour contrôler la GVH. Ce dernier objectif aborde la question de l'effet suppresseur de proximité ou « bystander » des Treg.

Ce projet de recherche repose dans sa globalité sur des modèles de GVH développés chez la souris. Brièvement, des souris receveuses sont létalement irradiées et reçoivent un greffon médullaire provenant d'une souris incompatible ou semi-incompatible. La GVH est induite par l'adjonction au greffon de Ly T prélevés chez la souris donneuse au niveau de ses ganglions périphériques. La particularité méthodologique de ce projet repose sur l'utilisation de moelle osseuse souris CD3e, classe I ou classe II KO pour répondre aux questions spécifiquement posées ici.

Nous devrions à terme définir l'impact des Treg sur les Ly T du donneur présent dans le greffon et donc la compatibilité de cette approche avec une utilisation clinique. Nous pensons également décrire plus en détail et, dans ce contexte si particulier sur le plan physiopathologique qu'est l'allogreffe de CSH, le mode d'action des Treg

Résultats

Gaidot, A., D. A. Landau, G. H. Martin, O. Bonduelle, Y. Grinberg-Bleyer, D. Matheoud, S. Gregoire, et al. 2011. « Immune Reconstitution Is Preserved in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Coadministered with Regulatory T Cells for GVHD Prevention ». Blood 117 (10): 2975-83.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

Rôle des cellules dendritiques plasmacytoides dans physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

GAUGLER Béatrice - EFS

[Retour tableau](#)

Résumé

La réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) caractérisée par une destruction des tissus de l'hôte, représente l'une des limitations majeures du traitement par allogreffe de cellules hématopoïétiques (CH). Les cellules dendritiques (DC), notamment les DC du receveur résistant à l'irradiation, mais aussi celles du donneur, participent à l'initiation de la GVHD, ou encore modulent sa sévérité. Les DC plasmacytoïdes (PDC) correspondent à une sous-population particulière de DC initialement décrites pour leur capacité à produire les IFN de type I en réponse à une infection virale, qui peuvent aussi dans certains cas induire des cellules T régulatrices et sont impliquées aussi dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Nous évaluerons dans ce projet le rôle des PDC dans l'initiation ou le maintien de la GVHD, et notamment sur les sites cibles de la GVHD. Nous adresserons ces questions i) dans deux modèles murins de GVHD déjà en place au sein de l'unité UMR645, (un modèle de GVHD aiguë et un second avec une forme sclérodermique de GVHD chronique) où nous étudierons les conséquences de la déplétion ou l'activation des PDC sur la survenue et la sévérité de la GVHD, l'induction des réponses cellulaires T (TH1, TH2, TH17 et T régulatrices), et la fonction des PDC dans les tissus cibles de la GVHD et ii) nous analyserons la présence et la fonction des PDC dans les biopsies de peau chez les patients traités par allogreffe de CH avec un conditionnement d'intensité réduite non myéloablatif et atteints de GVHD cutanée. Les résultats attendus de cette étude devraient nous permettre d'établir la relative contribution des PDC dans la physiopathologie de la GVHD, qui pourraient faire l'objet de nouvelles possibilités d'immunointerventions futures.

Résultats

Bossard, C, F Malard, J Arbez, P Chevallier, T Guillaume, J Delaunay, J-F Mosnier, et al. 2012. « Plasmacytoid dendritic cells and Th17 immune response contribution in gastrointestinal acute graft-versus-host disease ». *Leukemia* 26 (7): 1471-74.

Mohty, Mohamad, et Beatrice Gaugler. 2010. « Advances in umbilical cord transplantation: the role of thymoglobulin/ATG in cord blood transplantation ». *Best Practice & Research Clinical Haematology, Advances in Umbilical Cord Transplantation*, 23 (2): 275-82.

[Retour tableau](#)

Année: 2008

Reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire

VIEILLARD Vincent - AP-HP -Hop Pitié Salpêtrière

[Retour tableau](#)

Résumé

Les greffes géno-identiques de cellules souches hématopoïétiques (CSH) permettent de guérir certaines leucémies non curables par une chimiothérapie conventionnelle. Cependant, environ 60% des patients n'ont pas de donneurs HLA-identiques, familial ou non apparenté. Les greffes de CSH haplo-identiques étaient une alternative intéressante pour les patients sans donneur, mais les résultats cliniques furent désastreux avec une rechute leucémique chez plus de 90% des patients. Les greffes de sang placentaire chez des patients adultes leucémiques permettent d'obtenir une survie globale d'environ 60% et une très faible mortalité liée au conditionnement (<15%). L'obtention d'un système immunitaire fonctionnel à partir des cellules souches du donneur est un des événements qui concourent au succès d'une greffe de CSH d'origine médullaire, périphérique ou placentaire. Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée qui contribuent à l'élimination des cellules tumorales. Le sang placentaire semble être riche en cellules NK, mais aucune étude n'a évalué la reconstitution en cellules NK après greffes de sang placentaire. Pourtant, ces cellules NK sont parmi les premières à être générées après une greffe de CSH, plusieurs mois avant les lymphocytes T et sont donc pendant cette période les principaux acteurs responsables de l'absence de rechute leucémique. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer la reconstitution des cellules NK après greffe de sang placentaire chez les patients de la cohorte Minicord (PHRC national, Coordinateur Principal : B. Rio), porteurs de leucémies aiguës myéloblastiques. L'étude portera sur une cinquantaine de patients, elle sera quantitative et qualitative avec des études phénotypiques (récepteurs NK) et fonctionnelles (cytotoxicité vis-à-vis de cellules leucémiques) des cellules NK. De plus, la reconstitution NK sera corrélée avec différents facteurs cliniques comme la rechute, la GvH, la survenue d'infections et la survie globale. Il s'agit de la première étude réalisée chez des patients leucémiques recevant une greffe de sang placentaire qui pour but d'évaluer le rôle des cellules NK dans une thérapeutique innovante chez des patients en échec thérapeutique. Le projet original et pluridisciplinaire sera réalisé sur les échantillons de la Cohorte Minicord qui réunit plus de 30 services d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire dans toute la France dans le cadre du projet Minicord et le Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Tissulaire (INSERM U543) de la Pitié-Salpêtrière à Paris, permettant une mise en commun des compétences dans le domaine des hémopathies malignes réfractaires, des greffes de sang placentaire et de l'étude de la reconstitution en cellules NK.

Résultats

Beziat, V., D. Duffy, S. N. Quoc, M. Le Garff-Tavernier, J. Decocq, B. Combadiere, P. Debre, et V. Vieillard. 2011. « CD56brightCD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation ». *The Journal of Immunology* 186 (12): 6753-61.

Beziat, V., S. Nguyen, S. Lapsan, B. Hervier, N. Dhedin, D. Bories, M. Uzunov, et al. 2009. « Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation ». *Leukemia* 23 (4): 721–728.

Beziat, Vivien, Stéphanie Nguyen, Mark Exley, Abla Achour, Tabassonne Simon, Patrice Chevallier, Anne Sirvent, et al. 2010. « Shaping of INKT Cell Repertoire after Unrelated Cord Blood Transplantation ». *Clinical Immunology* 135 (3): 364-73.

Nguyen, S., A. Achour, L. Souchet, S. Vigouroux, P. Chevallier, S. Furst, A. Sirvent, et al. 2017. « Clinical Impact of NK-Cell Reconstitution after Reduced Intensity Conditioned Unrelated Cord Blood Transplantation in Patients with Acute Myeloid Leukemia: Analysis of a Prospective Phase II Multicenter

Trial on Behalf of the Société Française de Greffe de Moelle Osseuse et Thérapie Cellulaire and Eurocord ». Bone Marrow Transplantation 52 (10): 1428-35.

Nguyen, Stéphanie, Vivien Béziat, Damien Roos-Weil, et Vincent Vieillard. 2011. « Role of Natural Killer Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Myth or Reality? » Journal of Innate Immunity 3 (4): 383-94.

[Retour tableau](#)

Année: 2009

Production de lymphocytes T anti-adénovirus pour immunothérapie adoptive après allogreffe de CSh : protocole clinique

BENSOUSSAN Danièle - CHU Nancy

[Retour tableau](#)

Résumé

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH), s'accompagne d'un déficit immunitaire cellulaire et humoral plus ou moins prolongé. Cette immunodépression est à l'origine d'un grand nombre d'infections. Parmi celles-ci, les infections virales et en particulier celles dues à l'adénovirus (ADV) constituent un défi particulièrement important, peu de molécules étant actives à leur rencontre en l'absence de reconstitution immunitaire. L'incidence des infections à ADV varie de 5 à 21% chez les adultes et de 20 à 80 % chez les enfants. La mortalité peut atteindre 60 voire 73%. Les traitements antiviraux comme le cidofovir, molécule anti-virale à large spectre la plus largement utilisée, semblent présenter une efficacité relative lorsque le patient ne présente pas d'immunité spécifique anti-ADV. De plus, leurs toxicités (notamment rénale) rendent leur utilisation difficile.

En l'absence d'efficacité du Cidofovir, aucune alternative thérapeutique ne peut être proposée à ce jour face à une charge virale ADV augmentée et en l'absence de reconstitution immunitaire spécifique, ce qui peut conduire au décès du patient. C'est pourquoi, nous souhaitons initier la production de lymphocytes T cytotoxiques anti-ADV (CTL anti-ADV) à partir de cellules du donneur (leukaphérèse) à l'aide d'une technique rapide de grade clinique (Cytokine Capture System de Miltenyi) afin de proposer une alternative thérapeutique aux patients en échec de traitement par Cidofovir. Le principe de production des CTL anti-ADV repose sur le recueil de cellules mononucléées du donneur de CSH, préalablement testées pour leur réponse cellulaire anti-ADV. Ces cellules sont stimulées par un pool de peptides de la protéine Hexon de l'ADV5 (Peptivator-ADV5, Miltenyi Biotec, Allemagne) pendant 6 heures. Les cellules sécrétant de l'IFN γ sont ensuite sélectionnées sur CliniMACS en utilisant le Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec). Les CTL anti-ADV après isolement sont prêtes à être réinjectées. Une fraction est amplifiée in vitro en présence d'IL2 et de cellules de la fraction négative irradiée, afin de réaliser des contrôles qualité fonctionnels (en moyenne 2 Log d'amplification après 1 semaine de culture). Nous contrôlons par dosage de cytokines intracellulaires qu'après restimulation par le Peptivator ADV les CTL sécrètent de l'IFN γ . Un test de cytotoxicité contre des cellules cibles autologues chargées ou non avec du lysat viral d'ADV2 ou d'ADV5 est réalisé. Une culture mixte lymphocytaire permet de mesurer l'alloréactivité résiduelle des CTL vis-à-vis des PBMC du receveur.

Nous proposons un protocole pilote oligocentrique sous l'égide de la SFGM-TC et notamment du groupe pédiatrique, ayant pour objectif d'inclure 12 à 16 patients sur une durée maximale de 2 ans, présentant une infection à adénovirus en échec de traitement par Cidofovir, après une allogreffe de CSH génoidentique ou non apparentée 9/10 ou 10/10ème identique et chez lesquels l'immunité spécifique antiADV n'est pas reconstituée.

Résultats

Aïssi-Rothé, Lamia, Véronique Decot, Véronique Venard, Hélène Jeulin, Alexandra Salmon, Laurence Clement, Anne Kennel, et al. 2010. « Rapid Generation of Full Clinical-Grade Human Antiadenovirus

Cytotoxic T Cells for Adoptive Immunotherapy ». *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997) 33 (4): 414-24.

Campidelli, Arnaud, Chongsheng Qian, Caroline Laroye, Véronique Decot, Loïc Reppel, Maud D'aveni, et Danièle Bensoussan. 2018. « Adenovirus-specific T-lymphocyte efficacy in the presence of methylprednisolone: An in vitro study ». *Cytotherapy* 20 (4): 524-31.

Poster

Appel d'Offres « Recherche et greffe »



Production de lymphocytes T anti-adenovirus pour Immunothérapie adoptive après allogreffe de CSH : Protocole clinique CTL anti-ADV

Appel d'Offre Recherche et Greffe 2009
 Coordinateur : Pr D. BENSOUSSAN, UTCT, CHU de Nancy


Présentation du Protocole Clinique

Nombre de patients à inclure : 12

Ouverture du protocole : Mars 2012

Fin des inclusions : Septembre 2013

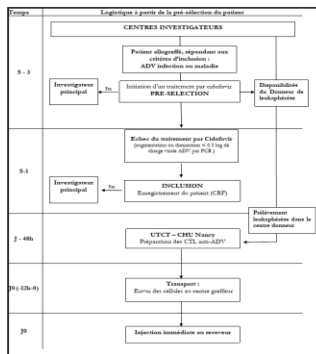
ETUDE PILOTE PHASE I/III
multicentrique
 Sous l'égide de la SFGM-TC
 Promoteur : CHU de Nancy
 Investigateur principal : Dr L CLEMENT
 Centres investigateurs associés : Besançon, Strasbourg, Lille, Rouen, Rennes, Nantes, Marseille, Montpellier, Clermont Ferrand, Bordeaux.
 Investigateurs Biologiques : UTCT, Plateforme Nancytomique, Laboratoires de Virologie



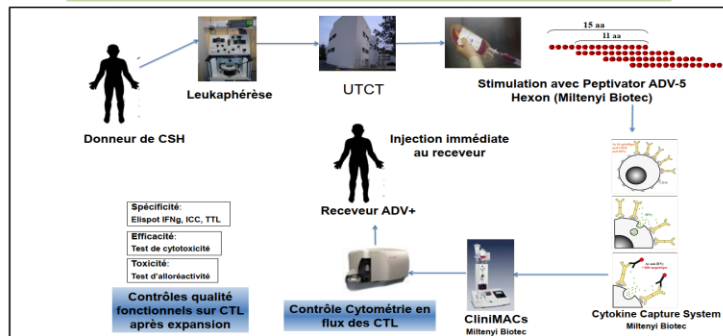
OBJECTIFS DE L'ETUDE
Principal :
 - Absence de GvH > II ou GvH chronique extensive
 - Absence de réactivation ou d'aggravation d'une GvH à 1 mois
Secondaire :
 - Évolution Charge ADV
 - Évolution Reconstitution Immunitaire spécifique anti-ADV

CRITERES D'INCLUSION
 - Allogreffes génoidentiques ou MUD (9 ou 10/10).
 - Adénovirose infection ou maladie en échec après un traitement par cidofovir
 - Toxicité rénale ou intolérance majeure
 - Non disponibilité du Cidofovir
 - GvH aiguë ou GvH chronique à forme aiguë < II,
 - GvH chronique contrôlée.

Schéma de traitement



Procédure de production des CTLs



Résultats

Nombre de patients pré-inclus : 8

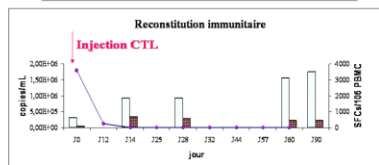
Nombre de patients inclus : 2

Nombre de patients traités : 1

Résultats des 2 Productions

N°	Avant isolement					Après isolement					
	CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4IFNg (%)	CD8 (%)	CD8IFNg (%)	CNT (10 ⁶)	CD4 (%)	CD4IFNg (%)	CD8 (%)	CD8IFNg (%)	Viabilité
1	713	29,59	0,14	18,83	0,34	7,56	0,76	58,97	0,68	9,32	65,48
2	906	32,34	0,12	23,45	0,1	22	7,05	29,57	2,65	22,04	31,33

Reconstitution Immunitaire / Charge ADV du patient 1



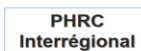
Conclusions et Perspectives

Un patient traité : avec efficacité clinique des CTL anti-ADV.

Efficacité des CTL anti-viraux d'autant plus importante que la charge virale n'est pas trop élevée

Problème : Taux de recrutement des patients Faible

Remerciements aux organismes ayant apporté leur soutien financier



Journées de l'Agence
 30-31 mai 2013

Contact: d.bensoussan@chu-nancy.fr

Année: 2009

Conservation à long et à court terme des cellules hématopoïétiques du sang placentaire après leur expansion ex vivo

IVANOVIC Zoran - EFS Aquitaine Limousin

[Retour tableau](#)

Résumé

Dans les Laboratoires R&D en Ingénierie Cellulaire et de Thérapie Cellulaire, ainsi que la banque de sang placentaire de l'Etablissement Français du Sang – Aquitaine Limousin (EFS-AL), nous avons développé une procédure d'expansion ex vivo à partir des cellules CD34+ du sang placentaire congelées. Ce système mis en « grand volume » s'est avéré très efficace (expansion cellulaire ~ 500 fois, expansion des cellules CD34+ et des progéniteurs x 150, aucune perte de capacité des cellules souches très primitives responsables de greffe en série des souris NOD/SCID. Il a été utilisé comme base biologique pour le PHRC qui consiste à greffer aux patients ces cellules après leur expansion (responsable de PHRC : Professeur Noël Milpied ; à débiter courant 2009). Ayant l'expérience dans le domaine de l'expansion ex vivo depuis une décennie, notre unité de thérapie cellulaire envisage la possibilité de réaliser l'expansion de cellules du sang placentaire pour les centres greffeurs éloignés.

Le but de ce projet est donc de tester la possibilité de conserver les cellules du sang placentaire obtenues par expansion ex vivo à partir des cellules CD34+ issues des unités de sang placentaire congelées. Ce projet a deux volets :

1. Conservation à long terme du produit d'expansion par congélation.
2. Conservation à court terme du produit d'expansion par stockage à basse température (+4°C).

La modalité qui s'avère acceptable pourrait permettre le transport de produits d'expansion et sa greffe dans le centre greffeur éloigné du Laboratoire de Thérapie Cellulaire en charge de l'expansion. Ainsi, un laboratoire d'expansion pourrait effectuer les expansions des cellules de sang placentaire pour un très vaste territoire (notre objectif primaire, est un délai de 48 H entre la fin de l'expansion et la greffe).

Pour chacune de ces modalités, deux conditions seront testées :

1. Les cellules seront congelées par la procédure standard (PBS avec 4% d'albumine), ou dans le milieu Macopharma HP01 (utilisé pour l'expansion ex vivo).
2. Les cellules seront stockées à +4°C en solution d'albumine 4% (préalablement lavées après l'expansion ex vivo), ou tout simplement gardées dans le milieu de culture (HP01 avec des cytokines).

Ces expériences (au moins 7 essais par condition) devraient fournir les données permettant :

- a) Soit de conclure et de choisir les conditions appropriées et de les appliquer au travail pratique. Soit d'obtenir les données d'orientation afin de concevoir les nouveaux protocoles de conservation de cellules expansées.

Résultats

Duchez, Pascale, Jean Chevaleyre, Philippe Brunet de la Grange, Marija Vlaski, Jean-Michel Boiron, et Zoran Ivanovic. 2013. « Functional Stability (at +4°C) of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Amplified Ex Vivo From Cord Blood CD34+ Cells ». Cell Transplantation 22 (8): 1501-6.

Duchez, Pascale, Jean Chevaleyre, Philippe Brunet de la Grange, Marija Vlaski, Jean-Michel Boiron, Guy Wouters, et Zoran Ivanovic. 2013. « Cryopreservation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

Amplified Ex Vivo from Cord Blood CD34+ Cells: Cryopreservation of Expanded CB ». *Transfusion* 53 (9): 2012-19.

CONSERVATION DES CELLULES DE SANG PLACENTAIRE APRÈS LEUR AMPLIFICATION EX-VIVO.



Coordinateur de projet: Zoran Ivanovic
 Participants: Pascale Duchez, Jean Chevalere, B Dazey¹, Marija Vlaski, Jean-Michel Boiron
 Etablissement Français du Sang Aquitaine Limousin, Place Amélie Raba Léon, BP 24, 33035 Bordeaux Cedex

INTRODUCTION

Nous avons développé un protocole clinique d'expansion ex vivo des cellules CD34+ sélectionnées à partir de sang placentaire décongelé. (Hematother & Stem Cell Res, 12:587, 2003). Pour permettre le transport du greffon vers les centres greffeurs éloignés, nous avons étudié différents modes de conservation.

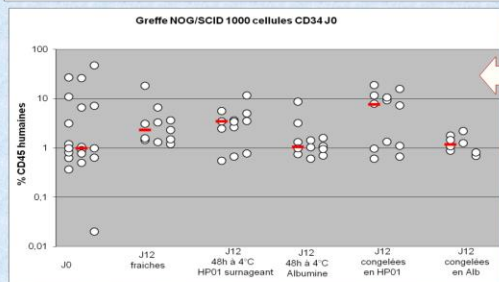
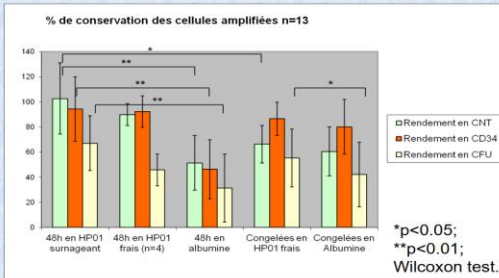


MATERIEL ET METHODE

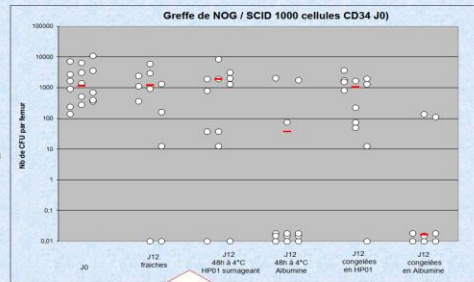
Les cellules CD34+ issues de sang placentaire décongelé sont amplifiées pendant 12 jours en milieu de culture HP01 Macopharma, enrichi en cytokines (SCF, Flt3, TPO et G-CSF) à 37°C, 5%CO2, 95% H2O (Ivanovic et al Cell Transplant 20: 1453, 2011, Duchez et al, Cell Transplant, en révision). Les cellules obtenues après amplification sont divisées en 4 fractions identiques :
 -Deux fractions sont conservées en poche de transfert à +4°C pendant 48 heures, la première dans le surnageant de culture de l'expansion et la seconde re-suspendue en condition standard : albumine humaine 4%.
 -Les deux dernières fractions sont congelées en azote liquide selon le programme de descente en température des cellules souches, l'une en milieu de culture HP01 supplémenté en albumine humaine 4% final et l'autre en albumine humaine 4%, puis décongelées après quelques jours de stockage à -196°C.
 Pour comparer ces différents modes de conservation, nous avons analysé les cellules nucléées totales (CNT), les cellules CD34+ et les progéniteurs engagés détectés par le test clonogénique (CFC totales) dans les quatre fractions du greffon. Nous avons également étudié l'activité des cellules souches primitives SRC (Scid Repopulating Cells) par xénogreffe chez la souris NOG-SCID pour ces 4 modes de conservation après amplification. Les souris sont traitées au Busulfan et reçoivent l'équivalent de 1000 cellules CD34+ au temps 0.

RESULTATS

Le maintien à +4°C de toutes les catégories de cellules à 48 h est très médiocre si les cellules sont gardées en albumine humaine 4% (le rendement de CFU est de 35% seulement). Les cellules après leur amplification ex vivo sont beaucoup mieux maintenues en milieu de culture (HP01 + cytokines) : la totalité des CNT et des CD34 et environ 70% de CFU sont maintenus à +4°C à 48 heures. Des rendements similaires sont obtenus avec le milieu HP01 frais dont les cellules sont re-suspendues après lavage. La cryopréservation (congélation, maintien en état congelé pendant au moins 7 jours, décongélation) maintient les cellules CD34+ (aux alentours de 90%) et les progéniteurs engagés (près de 60%). Le fait de congeler les cellules en HP01 a un effet positif sur les progéniteurs engagés (CFU) par rapport à la congélation en albumine (la différence est statistiquement significative).



L'activité des SRC-CD est plutôt bien maintenue à 48 h à +4°C. Cependant, le milieu de culture HP01 présente un avantage en ce qui concerne le taux de chimérisme moyen. La congélation en HP01 maintient la totalité des SRC évalués par les CD45, alors qu'elle est moins efficace si le produit d'expansion est congelé en albumine.



En analysant la présence de progéniteurs humains engagés dans la moelle osseuse des souris 7 à 8 semaines après la greffe, nous avons pu obtenir les informations sur une sous-population SRC (SRC-CFU) un peu plus primitive que SRC-CD. Ainsi, le nombre absolu de ces progéniteurs par fémur reflète l'activité de cette sous-population particulière des SRC. Nos résultats montrent qu'avec HP01, que cela soit à 4°C ou après congélation/décongélation, ces cellules amplifiées ex vivo sont complètement maintenues. Ceci n'est pas le cas en condition « Albumine ».

CONCLUSION

i) le maintien à +4°C en albumine (condition de la routine actuelle) détériore les cellules dans un produit d'expansion. Cette détérioration concerne plus les progéniteurs engagés (CFU), elle est visible au niveau des cellules souches (sous-population SRC-CD) ainsi que sur la sous-population SRC-CFU. Ce résultat est nettement amélioré si les cellules sont maintenues à +4°C en milieu de culture (HP01). Le taux de préservation des cellules CD34, des progéniteurs engagés (CFU), des SRC-CD ainsi que des SRC-CFU dans cette condition nous semble intéressant pour une application clinique. Au vu du taux d'amplification des progéniteurs clonogéniques et des cellules CD34, les pertes à 48 h pourront probablement être jugées acceptables pour permettre le transport d'un greffon amplifié jusqu'au centre greffeur dans le monde entier.
 ii) qu'un produit d'expansion peut être cryo-préserver (congelé, maintenu en état congelé et décongelé) avec une perte cellulaire acceptable si le processus est effectué en milieu HP01. La procédure standard (en albumine), en dépit des apparences au niveau des cellules CD34, protège moins bien les cellules souches (SRC-CD) et surtout SRC-CFU.
 Nous pouvons conclure que l'efficacité du maintien des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques dans un produit d'expansion à partir des cellules CD34 du Sang Placentaire à +4°C et en congélation/décongélation est améliorée en présence de milieu HP01.
 Nous considérons que le résultat de ce projet justifie une mise au point pré-clinique « grandeur nature » de ces deux conditions avec HP01. Ce processus devrait optimiser les proportions du volume des réactifs afin d'assurer des rendements stables et intéressants pour une utilisation clinique.
 La portée finale de cette mise au point devrait se résumer en deux procédés qui risquent d'avoir un impact majeur sur le déploiement et la généralisation des greffes des cellules hématopoïétiques après leur expansion ex vivo : i) « transportabilité » des greffons amplifiés sans limite de distance; ii) amplification et congélation des greffons pour une utilisation ultérieure.

Année: 2009

Evaluation à long terme des patients traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

MOHTY Mohamad - Cellule de Promotion de la Recherche Clinique, CHU de Nantes

[Retour tableau](#)

Résumé

Justification. Bien que les patients survivant au-delà de 2 ans après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-SCT), aient une forte probabilité d'être guéris, ils sont toujours exposés à des complications qui pourraient survenir au long cours, incluant notamment les effets délétères de la maladie chronique du greffon contre l'hôte (cGVHD), un dysfonctionnement immunitaire, ou encore les conséquences de la chimiothérapie et/ou radiothérapie reçus dans le conditionnement. Vue l'origine iatrogène de ces complications, le suivi à long terme de ces patients est de la responsabilité de l'équipe de transplantation. Toutefois, des données fiables portant sur les complications au long cours chez des patients allogreffés en France font encore défaut dans ce domaine.

Patients et méthodes. Il s'agit d'une étude non-interventionnelle impliquant le CHU de Nantes et l'Institut Paoli-Calmettes à Marseille. Plus de 300 patients seront inclus. L'objectif est d'analyser les complications à long terme chez des patients qui ont survécu au moins 2 ans après allo-SCT. L'étude concernera les patients ayant: (1) un diagnostic de maladie hématologique (2) allogreffe entre 1996 et 2006, et (3) survie d'au moins 2 ans après allo-SCT. Cette étude sera réalisée à l'aide de questionnaires précédemment validés dans ce domaine. Les questionnaires permettront d'évaluer les effets secondaires tardifs, l'état de santé actuel, l'usage de médicaments, les comportements, une histoire de grossesse après allo-SCT, les indicateurs socio-économiques, les problèmes d'assurance, la qualité de vie, et certains détails spécifiques qui permettront d'évaluer les caractéristiques et la sévérité de la cGVHD, ainsi que son impact fonctionnel. Les participants seront invités par exemple à préciser les limitations qui interfèrent avec leurs activités quotidiennes, et l'impact de ces limitations fonctionnelles sur leur qualité de vie. Les réponses aux questions sont structurées selon le schéma "oui/non/ne sais pas". Une réponse de type «oui», exigerait du patient d'indiquer la date à laquelle la complication est survenue.

Certaines questions utiliseront des échelles pour «quantifier» le degré de la déficience. Les autres informations sur le diagnostic et les caractéristiques de la transplantation seront obtenues à partir des bases de données institutionnelles. Les autres variables socio-démographiques dans l'analyse comprendront l'âge au moment de l'étude, le niveau d'éducation, et le revenu du foyer. Au total, les objectifs qui seront couverts toucheront à plusieurs domaines, notamment: 1) la santé globale du patient, 2) la santé mentale, 3) la déficience fonctionnelle, 4) la limitation d'activité, 5) la douleur, 6) la notion de peur ou d'anxiété, 7) les effets secondaires médicaux comme le diabète, l'hypertension artérielle, les complications cardiovasculaires etc., 8) la qualité de vie, et 9) la cGVHD.

Perspectives. Actuellement, peu de données sont disponibles sur les complications au long cours et la qualité de vie des patients allogreffés en France au cours des 10 dernières années. Les données recueillies dans cette étude permettront de fournir aux investigateurs dans ce domaine, ainsi qu'aux agences de tutelle des informations précises pour mieux comprendre les complications à long terme de l'allo-SCT et donc d'identifier les besoins et les domaines de recherche à développer

Résultats

Bodet-Milin, C., M. Lacombe, F. Malard, E. Lestang, X. Cahu, P. Chevallier, T. Guillaume, et al. 2014. « 18F-FDG PET/CT for the Assessment of Gastrointestinal GVHD: Results of a Pilot Study ». *Bone Marrow Transplantation* 49 (1): 131-37.

Malard, F., S. Fürst, M. Loirat, P. Chevallier, J. El-Cheikh, T. Guillaume, J. Delaunay, et al. 2013. « Effect of Graft Source on Mismatched Unrelated Donor Hemopoietic Stem Cell Transplantation after Reduced Intensity Conditioning ». *Leukemia* 27 (11): 2113-17.

Mohty, B, et M Mohty. 2011. « Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update ». *Blood Cancer Journal* 1 (4): e16.

Mohty, Mohamad. 2007. « Dendritic cells and acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation ». *Leukemia & Lymphoma* 48 (9): 1696-1701.

Mohty, Mohamad, et Jane F. Apperley. 2010. « Long-Term Physiological Side Effects After Allogeneic Bone Marrow Transplantation ». *ASH Education Program Book 2010* (1): 229-36.

Tessoulin, B., J. Delaunay, P. Chevallier, M. Loirat, S. Ayari, P. Peterlin, S. Le Gouill, et al. 2014. « Azacitidine Salvage Therapy for Relapse of Myeloid Malignancies Following Allogeneic Hematopoietic SCT ». *Bone Marrow Transplantation* 49 (4): 567-71.

[Retour tableau](#)

Année: 2010

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

PIAGGIO Eliane - hôpital la Pitié Salpêtrière - CERVI

[Retour tableau](#)

Résumé

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

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

Ce projet repose sur deux objectifs principaux.

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

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

Résultats

Pérol, Louis, Gaëlle H. Martin, Sébastien Maury, José L. Cohen, et Eliane Piaggio. 2014. « Potential Limitations of IL-2 Administration for the Treatment of Experimental Acute Graft-versus-Host Disease ». Immunology Letters 162 (2): 173-84.

[Retour tableau](#)

Année: 2011

Optimisation de la recolonisation thymique après greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines

CANQUE Bruno - INSERM ADR 7

[Retour tableau](#)

Résumé

Objectifs : le programme de recherche proposé vise à optimiser la restauration de la thymopoïèse chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il a pour principal objectif de définir le rôle joué par les cellules colonisatrices du thymus, les préthymocytes, dans ce contexte.

Résultats attendus et méthodologie : Au cours de l'année écoulée nous avons implanté au laboratoire un modèle de xénogreffe chez la souris NSG de progéniteurs hématopoïétiques humains isolés de sang placentaire, ceci afin d'étudier des mécanismes contrôlant l'émergence et la dynamique des préthymocytes médullaires (Haddad et col. *Immunity* 2006, 24:217). Nous avons montré par ailleurs, à travers la caractérisation fonctionnelle de la protéine oncogénique AF1q, que la différenciation de ces cellules repose sur un contrôle subtil de la susceptibilité intrinsèque des progéniteurs hématopoïétiques multipotents à l'engagement des récepteurs de la famille Notch (Parcelier et al, soumis). Les résultats déjà obtenus démontrent la pertinence de l'utilisation du modèle murin NSG pour l'étude de la biologie des préthymocytes. On détecte en effet 4 semaines après la greffe une population abondante de préthymocytes dans la moelle osseuse des animaux reconstitués. Cette population est également retrouvée à l'état de traces dans la rate, ainsi que dans le thymus dont elle constitue le contingent cellulaire le plus immature. Le suivi cinétique des animaux révèle par ailleurs un déclin rapide de la population de préthymocytes médullaires corrélé à l'épuisement progressif de la thymopoïèse. Cette cinétique est tout à fait superposable à celle que nous avons décrite au sein de la moelle osseuse humaine. Les mécanismes responsables du déclin des préthymocytes restent encore mal connus. Il s'agira ici de définir les rôles joués respectivement par le vieillissement du compartiment des cellules souches hématopoïétiques et par le remodelage post-natal du micro-environnement médullaire dans leur disparition. Notre hypothèse de travail s'articule autour du contrôle moléculaire de la voie de signalisation Notch. Il s'agira notamment de relier le déclin des préthymocytes à un déficit fonctionnel de la voie Notch au sein des progéniteurs hématopoïétiques et/ou des cellules stromales. Nous testerons ensuite diverses stratégies visant à compenser le défaut de colonisation thymique lié à la raréfaction des préthymocytes médullaires.

Résultats

Parietti, V., E. Nelson, G. Telliam, S. Le Noir, M. Pla, M. Delord, V. Vanneaux, et al. 2012. « Dynamics of Human Prothymocytes and Xenogeneic Thymopoiesis in Hematopoietic Stem Cell-Engrafted Nonobese Diabetic-SCID/IL-2r Null Mice ». *The Journal of Immunology* 189 (4): 1648-60.

[Retour tableau](#)

Année: 2011

Etude rétrospective et multicentrique de l'alloréactivité des cellules NK dans la prise de greffe de double sang de cordon

GAGNE Katia - EFS Pays de Loire

[Retour tableau](#)

Résumé

La greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) d'origine placentaire (greffe de sang de cordon) est une alternative à la greffe de CSH d'origine médullaire (MO) ou périphérique (CSP) pour les patients atteints de pathologies malignes en l'absence d'un donneur HLA 10/10 identique. Le choix d'une unité de sang de cordon repose en particulier sur la quantité de cellules CD34+ et le niveau de compatibilité des gènes HLA-A, -B et -DRB1, ces 2 facteurs étant associés à la prise du greffon. L'immaturité des cellules immunitaires des unités de sang de cordon permet d'accepter certaines incompatibilités HLA de classe I entre le greffon et le patient. Etant donné que ces incompatibilités cordon/patient sont principalement ciblées au niveau des molécules HLA-Cw, principaux ligands des KIR, nous émettons l'hypothèse que les réponses NK KIR alloréactives pourraient jouer un rôle sur la prise de greffe de sang de cordon. Par ailleurs, chez les patients adultes, afin d'augmenter la quantité de cellules CD34+ injectées et d'améliorer la probabilité de prise de greffe, l'utilisation de 2 unités de sang de cordon a été développée et dans la plupart des greffes, seul l'un des 2 cordons contribue à l'hématopoïèse du patient. Les explications cliniques et/ou immunologiques de la prise d'un des deux greffons restent énigmatiques. Dans ce contexte de « ménage à 3 », impliquant des réponses lymphocytaires T et NK alloréactives non seulement entre chaque cordon et le patient mais aussi entre les 2 cordons, l'alloréactivité T et/ou NK pourrait jouer un rôle dans la prise d'un seul cordon. A l'heure actuelle, aucune étude portant sur l'impact combiné des disparités des gènes KIR et des KIR ligands sur la prise de greffes de sang de cordon n'a été publiée. En collaboration avec la SFGM-TC, RFGM et la SFHI, nous mènerons une étude génétique multicentrique et rétrospective de l'impact des incompatibilités des KIR ligand, des gènes KIR et des combinaisons KIR/KIR ligand sur la prise d'un seul cordon à partir de 150 double-greffes de sang de cordon.

Les données génotypiques (typages des gènes KIR et KIR ligand), biologiques et cliniques seront confrontées dans des analyses statistiques multivariées. En parallèle, nous étudierons le répertoire NK KIR au niveau phénotypique et fonctionnel par cytométrie de flux à partir de prélèvements placentaires issus de la maternité du CHU de Nantes afin de mieux appréhender l'alloréactivité des cellules NK KIR contribuant à la prise de greffe au niveau cellulaire. L'étude génétique doit nous permettre de dégager l'impact de certains KIR ou de combinaisons KIR/KIR ligand sur la prise de double-greffes de sang de cordon. En particulier, la prise en compte des génotypes KIR des cordons pourrait constituer un outil pronostic dans la prise du greffon.

Résultats

Rettman, Pauline, Nolwenn Legrand, Catherine Willem, Laurence Lodé, Patrice Chevallier, Anne Cesbron, David Senitzer, Christelle Retière, et Katia Gagne. 2015. « Use of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Genes as Early Markers of Hematopoietic Chimerism after Double-Umbilical Cord Blood Transplantation ». *Haematologica* 100 (11): e475-79.

[Retour tableau](#)

Année: 2011

Rôle de l'IL-22 dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte

GAUGLER Béatrice - EFS Bourgogne Franche Comté

[Retour tableau](#)

Résumé

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-SCT) est utilisée pour le traitement des hémopathies malignes. Le bénéfice curatif de l'allo-SCT est dû à l'effet du greffon contre la leucémie (GVL), au cours duquel les cellules tumorales résiduelles sont reconnues et éliminées par des mécanismes immunologiques. Cependant, l'allo-SCT est limitée par les complications liées à la toxicité des procédures et à la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Des études précédentes ont démontré le rôle des lymphocytes TH1 dans la physiopathologie de la GVHD, ou plus récemment la contribution des sous-populations TH17 et Treg. L'interleukine-22 (IL-22) appartient à la famille de l'IL-10, et est produite par de nombreuses cellules, notamment les TH1, TH17 et cellules NK. Sa principale fonction décrite est de participer à l'immunité innée, en induisant la production de peptides antimicrobiens comme les b-défensines, par les cellules épithéliales. L'IL-22 peut exercer soit un rôle protecteur ou pathologique dans les maladies inflammatoires selon le tissu affecté ou le milieu environnant. Etant donné le large spectre d'activités de l'IL-22, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pouvait être impliquée dans le développement de la GVHD. C'est ce que nous voulons étudier dans un modèle expérimental murin de GVHD aiguë en utilisant des souris déficientes pour l'IL-22. Nos données préliminaires indiquent que la déficience en IL-22 des lymphocytes T allogéniques réduit significativement la mortalité et la sévérité de la GVHD, suggérant un rôle pathologique dans ce contexte expérimental. Nos objectifs visent à étudier l'influence de l'IL-22 dans la GVHD et l'effet GVL et de comprendre les mécanismes associés. Nous proposons dans ce projet i) d'évaluer si l'effet GVL est préservé en l'absence de production d'IL-22 par les lymphocytes T, ii) d'identifier les mécanismes impliqués dans les effets délétères de l'IL-22 : pour cela, nous caractériserons l'expression des défensines et cathélicidines dans les tissus cibles de la GVHD, nous déterminerons également la régulation des sous-populations lymphocytaires TH1, TH17, TH22 et Treg dans le modèle et iii) nous évaluerons le rôle de l'IL-22 en caractérisant les cellules T infiltrantes et l'expression des défensines et cathélicidines des biopsies intestinales d'une cohorte de 20 patients atteints de GVHD. Cette étude permettra pour la première fois de caractériser le rôle de l'IL-22 dans la GVHD et la contribution des défensines dans cette maladie. Comme le nombre de patients traités par allo-SCT continue de croître avec les nouvelles procédures, une meilleure compréhension des facteurs de risque de GVHD, des mécanismes cellulaires et cytokines impliqués dans sa physiopathologie, ainsi que des stratégies de prévention et de traitement sont encore nécessaires. Les résultats escomptés de cette étude devraient déboucher sur de nouvelles perspectives de modulation de la GVHD en ciblant l'action de l'IL-22.

Résultats

Couturier, M, B Lamarthée, J Arbez, J-C Renauld, C Bossard, F Malard, F Bonnefoy, et al. 2013. « IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect ». *Leukemia* 27 (7): 1527-37.

Gaugler, Béatrice, Baptiste Lamarthée, Mélanie Couturier, et Philippe Saas. 2013. « Interleukine 22: Son rôle dans la maladie du greffon contre l'hôte ». *médecine/sciences* 29 (6-7): 577-79.

Lamarthée, B., F. Malard, C. Gamonet, C. Bossard, M. Couturier, J.-C. Renauld, M. Mohty, P. Saas, et B. Gaugler. 2016. « Donor Interleukin-22 and Host Type I Interferon Signaling Pathway Participate in

Intestinal Graft-versus-Host Disease via STAT1 Activation and CXCL10 ». *Mucosal Immunology* 9 (2): 309-21.

Mohty, Mohamad, Eolia Brissot, Bipin N. Savani, et Beatrice Gaugler. 2013. « Effects of Bortezomib on the Immune System: A Focus on Immune Regulation ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19 (10): 1416-20.

Appel d'Offres « Recherche et greffe »

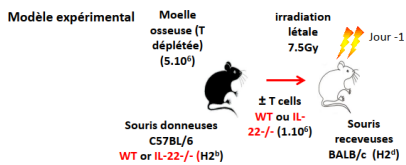
L'Interleukine-22 contribue à la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules hématopoïétiques

M Couturier, B Lamarthée, P Saas et B Gaugler
INSERM UMR1098, EFS Bourgogne Franche-Comté, Université de Franche-Comté, Besançon, France

Objectifs

L'allogreffe de cellules hématopoïétiques (allo-CH) est une thérapeutique pour les patients atteints d'hémopathies malignes. Cependant, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) reste une complication majeure après allo-CH entraînant une morbidité et mortalité importante. La GVHD aiguë (aGVHD) correspond à une réponse immunitaire inflammatoire exacerbée qui conduit à la destruction des tissus sains du receveur par les cellules immunitaires du donneur. L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine essentielle à la défense de l'organisme contre les pathogènes extracellulaires au niveau des muqueuses. Elle est produite aussi bien par des cellules de l'immunité innée qu'adaptative. Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ (Th1, Th17, Th22), les lymphocytes T γδ, les cellules NKT, les cellules lymphoïdes de l'immunité innée sont autant de sources d'IL-22. Le récepteur IL-22R n'est pas exprimé sur les cellules hématopoïétiques, mais exclusivement sur des cellules épithéliales des tissus comme la peau, l'intestin, le colon et le poumon. L'IL-22 permet la production de médiateurs inflammatoires, comme l'IL-6, IL-1β, le G-CSF ou des chimiokines CXCL1 et CXCL9. La signalisation dérégulée de la cascade IL-22/IL-22R est impliquée dans les maladies inflammatoires de l'intestin. **Compte-tenu des propriétés de l'IL-22 dans les tissus qui sont le plus souvent la cible de la GVHD, nous avons évalué sa contribution dans le développement de cette maladie en utilisant un modèle expérimental de GVHD aiguë.**

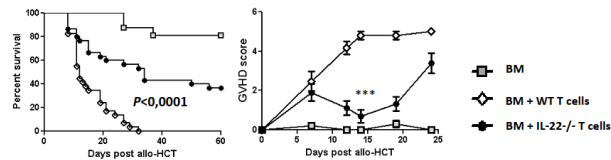
Méthodologie



Les scores cliniques sont déterminés au cours du suivi post-greffe (perte de poids, posture, intégrité et texture de la fourrure). Les plasmas sont dosés pour leur contenu en cytokine en ELISA à J7 post-greffe. Les splénocytes sont analysés en cytométrie de flux à J7 et J14 post-greffe pour analyser les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

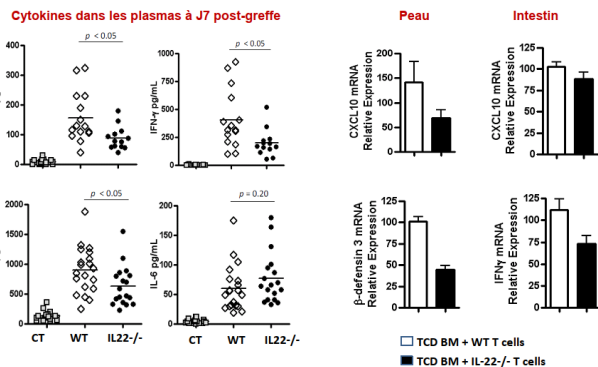
Résultats / Conclusion

1- L'absence d'IL-22 dans les lymphocytes T du donneur diminue la sévérité de la GVHD

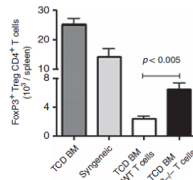


Les souris receveuses irradiées ont reçu de la moelle osseuse et des lymphocytes T de souris donneuses allogéniques soit sauvages (WT) soit déficientes pour l'IL-22. La survie des souris et les scores cliniques sont présentés sur les graphes (N=30 souris/groupe et 5 expériences indépendantes (log-rank test, P<0.0001 pour le groupe WT versus IL22-/-).

2- L'absence d'IL-22 dans les lymphocytes T du donneur diminue l'inflammation systémique et dans les organes cibles de la GVHD



3- Augmentation des lymphocytes T régulateurs (Treg) à J6 post-greffe dans les souris ayant reçu des lymphocytes T déficients en IL-22



CONCLUSION:

Dans cette étude, nous avons montré que l'IL-22 provenant des lymphocytes T donneurs participe au développement et à la sévérité de la GVHD aiguë en contribuant à l'inflammation locale et systémique. La diminution de la sévérité de la maladie observée en absence d'IL-22 semble être dépendante des Treg. Les analyses vont être poursuivies pour déterminer l'effet de l'IL-22 provenant des cellules du receveur. Le ciblage de l'IL-22 pourrait à terme devenir une approche pour moduler la GVHD.

Année: 2011

Immunomonitoring du risque infectieux en transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pédiatrique

STERKERS Ghislaine - Hôpital Robert Debré

[Retour tableau](#)

Résumé

Les infections virales sont une cause importante de morbidité et de mortalité après greffe de CSH particulièrement chez l'enfant. Le cytomégalo virus (CMV) est le plus souvent en cause dans les infections virales opportunistes. Les infections dues aux virus influenza peuvent également entraîner des symptômes cliniques sévères. Les infections à adénovirus (AdV) posent un problème spécifiquement chez l'enfant avec une mortalité s'élevant jusqu'à 50% en cas de virémie. Des progrès en matière de diagnostic par l'utilisation des techniques de PCR ainsi que l'amélioration des protocoles de chimiothérapies antivirales (au prix d'une toxicité non négligeable) ont permis d'améliorer le pronostic. Le transfert de lymphocytes immuns reste la seule alternative en cas de déficit immunitaire profond.

Qui ?, quand ? et comment traiter ? reste une question de première importance.

L'utilisation en soins courants de marqueurs biologiques immunologiques prédictifs du risque infectieux pourrait répondre à ces questions.

Nos travaux depuis 2007 ont permis de 1) déterminer les « normes » des réponses immunes cellulaires anti-CMV et -AdV chez l'enfant (Pédrón B et al. *Pediatric Research* Epub ahead 2010), 2) identifier des biomarqueurs immunologiques corrélés avec une protection versus un risque majeur d'infection sévère à AdV et CMV (El Khourouj VG et al. *Biol Bone Marrow Transplant* 2010 et Guérin, V et al. *Bone Marrow Transplant* 2010), 3) produire et évaluer des préparations de CTL anti-AdV à visée de transfert adoptif (Aissi-Rothé et al *J Immunother* 2010) et 4) d'évaluer en condition de génoidentité, les délais post-greffes compatibles avec une immunogénicité des vaccins influenza.

Notre projet identifiera les biomarqueurs immunologiques les plus pertinents pour :

- 1) alléger les surveillances virologiques (onéreuses) et sursoir aux traitements préemptifs (exposant à des complications) sur la base de la récupération d'une immunité cellulaire efficace, 2) prescrire précocement des infusions de CTL pour les enfants répliatifs incapables de développer des réponses immunes efficaces.
- 3) définir le timing optimal des vaccinations anti-influenza en condition de phénoïdentité et/ou identité HLA partielle.

Pour ce faire, 50 enfants consécutifs à haut risque infectieux (greffes phénoïdentiques \geq 9/10, haploïdentiques et sang de cordon) seront inclus sur une période de 18 mois avec un suivi minimum de 6 mois. Les résultats des PCR systématiques dans le sang (AdV, CMV), dans les selles (AdV), hebdomadaires et dans les sécrétions nasales en cas de symptômes grippal seront confrontés à la numération de lymphocytes T-IFN γ + spécifiques des virus CMV, AdV et influenza et aux symptômes cliniques.

Résultats

Jeljeli, Mohamed, Valérie Guérin-El Khourouj, Raphael Porcher, Mony Fahd, Sandrine Leveillé, Karima Yakouben, Marie Ouachée-Chardin, et al. 2014. « Relationship between Cytomegalovirus (CMV)

Reactivation, CMV-Driven Immunity, Overall Immune Recovery and Graft-versus-Leukaemia Effect in Children ». *British Journal of Haematology* 166 (2): 229-39.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Etude de la reconstitution des cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'enfant

CAILLAT-ZUCMAN Sophie - Association Robert Debré pour la Recherche Médicale

[Retour tableau](#)

Résumé

La reconstitution immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une étape capitale qui va permettre au patient de retrouver des moyens de défense efficaces contre les agents pathogènes et les cellules tumorales. Il est donc crucial de bien comprendre la dynamique de reconstitution des différents composants du système immunitaire, afin de déterminer leur rôle respectif dans la survenue des infections et des rechutes leucémiques, mais également dans la survenue de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

Les cellules MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) représentent une sous-population récemment décrite de lymphocytes T CD3+ qui expriment un TCR invariant Va7.2-Ja33 restreint par la molécule d'histocompatibilité non classique et non polymorphe MR1. La fréquence des MAIT est élevée dans le sang circulant (1-8% des lymphocytes T CD3), et plus encore dans l'intestin et le foie, deux sites préférentiels de la GVHD. A la différence des lymphocytes T conventionnels, les MAIT s'activent très rapidement et sans stimulation antigénique préalable, notamment en présence de cellules infectées par des agents pathogènes bactériens ou fongiques, ce qui suggère qu'ils pourraient exercer d'importantes fonctions antimicrobiennes. Alors que la reconstitution des lymphocytes T conventionnels après greffe est bien étudiée, il n'existe aucune donnée sur la reconstitution des MAIT et sur les conséquences pathologiques éventuelles associées à une anomalie quantitative ou qualitative de leur reconstitution. Deux caractéristiques essentielles des MAIT, leur fonction antimicrobienne et leur localisation digestive préférentielle, nous incitent tout particulièrement à étudier leur contribution dans le contrôle des infections et dans la survenue d'une GVHD. Nos objectifs sont:

1/ d'analyser de manière séquentielle en cytométrie de flux multiparamétrique la reconstitution des MAIT dans le sang circulant au cours de la 1ère année après allogreffe de CSH chez 60 enfants greffés dans le Service d'Hématologie Pédiatrique de l'hôpital Robert Debré (Paris) sur une période de 12 mois.

2/ d'étudier la corrélation éventuelle entre la reconstitution des MAIT et la survenue de GVHD, d'infection ou de rechute leucémique.

Le nombre absolu et la fréquence des cellules MAIT seront déterminés en cytométrie de flux 8 couleurs, simultanément à la quantification des lymphocytes conventionnels réalisée systématiquement en routine 1, 3, 6 et 12 mois après greffe. Les MAIT seront identifiés par la coexpression des marqueurs CD3+, Va7.2+ CD161high sur les lymphocytes CD4-CD8α+. Cette étude longitudinale sera réalisée sur 2 ans : tous les enfants étant inclus au terme de la 1ère année, le dernier point de suivi à 12 mois sera complété à la fin de la 2ème année.

Les résultats de cette étude permettront de savoir si le suivi de la reconstitution des cellules MAIT représente un élément de surveillance utile pour identifier les patients à risque d'infection, de GVHD ou de rechute.

Résultats

Youssef, Ghada Ben, Marie Tourret, Marion Salou, Liana Ghazarian, Véronique Houdouin, Stanislas Mondot, Yvonne Mburu, et al. 2018. « Ontogeny of Human Mucosal-Associated Invariant T Cells and Related T Cell Subsets ». *Journal of Experimental Medicine* 215 (2): 459-79.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Réponses fonctionnelles des Polynucléaires Neutrophiles vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus* chez les patients allogreffés de moelle osseuse

ELBIM Carole - ADR 6

[Retour tableau](#)

Résumé

OBJECTIFS

L'aspergillose invasive est une infection fongique profonde extrêmement grave à point de départ le plus souvent pulmonaire survenant fréquemment chez les patients immunodéprimés comme les allogreffés de moelle osseuse (AGMO) sous immunosuppresseurs. Le polynucléaire neutrophile (PN) constitue une des premières barrières de défense contre l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme. Alors que le rôle crucial du PN dans le contrôle de l'infection aspergillaire a été clairement établi, aucun travail n'a jusqu'à ce jour étudié le fonctionnement précis et détaillé des PN de patients AGMO en réponse à *Aspergillus fumigatus*, le principal agent de l'aspergillose invasive.

L'objectif de ce projet est d'étudier au sein d'une cohorte de patients AGMO et suivis de façon longitudinale le comportement des PN vis-à-vis d'*A. fumigatus* à différents temps critiques de la greffe. Cette étude sera réalisée au niveau fonctionnel et protéomique. L'expression des différents récepteurs de l'immunité impliqués dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* par le PN ainsi que l'environnement cytokinique seront évalués en parallèle.

Afin d'offrir un contrôle robuste, les caractéristiques des PN du donneur (dont il est attendu qu'ils possèdent des fonctions normales) seront étudiées et comparées par la suite à celles des PN du receveur après greffe.

Les PN des receveurs seront étudiés :

- en post-greffe précoce, en sortie d'aplasie)
- à différents temps post-greffe : 2 mois, 6 mois, et 10 mois

RESULTATS ATTENDUS

Il est attendu que la fonctionnalité en pré-greffe soit normale ; et perturbée en post-greffe précoce et au cours des épisodes de GVH sous immunosuppresseurs. Cependant, chez les patients en rémission complète, il est envisageable que l'administration à long terme de traitements immunosuppresseurs, notamment la ciclosporine, puisse altérer le fonctionnement des PN, même à distance de l'arrêt du traitement.

METHODOLOGIE

1. Expression à la surface du PN des différents récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance d'*A. fumigatus* par le PN à savoir les récepteurs de type "Toll-like receptor" : TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-9 ainsi que la Dectine-1. Elle sera effectuée au niveau protéique par cytométrie en flux et transcriptionnel par qPCR.

2. Exploration fonctionnelle des PN :

Elle sera réalisée de façon originale dans des conditions de sang total par cytométrie en flux afin d'éviter toute procédure d'isolement des PN susceptible de les activer. Elle comportera l'étude de 1) l'expression des molécules d'adhérence à la surface cellulaire, 2) la production de formes réactives de l'oxygène

(FRO), 3) la phagocytose, 4) la survie, et 5) le niveau d'activation des voies transductionnelles mises en jeu par l'interaction des ligands aspergillaires avec leurs récepteurs (NF- κ B, MAPK, Syk)

Elle sera effectuée après stimulation par différents antigènes aspergillaires (1,3- β -D-glucan,...) mais également des ligands de TLR-1, TLR-2, TLR-4 et TLR-9.

La réponse cytokinique de l'hôte (cytokines pro- et anti-inflammatoires et réponse Th17 associée à une activation des PN) sera évaluée en parallèle dans les mêmes conditions de stimulation

3. L'approche protéomique sera réalisée par électrophorèse bidimensionnelle de type DIGE (differential in gel electrophoresis) : L'analyse consistera à comparer le protéome complet des PN du donneur au protéome complet des PN du receveur 1) en sortie d'aplasie et 2) chez les receveurs en rémission complète à 10 mois de la greffe.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Etude pharmacocinétique du Busulfan dans le conditionnement d'une greffe allogénique chez des patients à haut risque porteurs d'hémopathies

EL-CHEIKH Jean - Institut Paoli Calmettes

[Retour tableau](#)

Résumé

Le conditionnement (CDT) représente une phase importante de la greffe allogénique. Nous avons contribué à établir les conditionnements à intensité réduite (RIC) et nous avons notamment allogreffé 535 patients avec ce type de stratégie à travers des essais thérapeutiques successifs. Dans notre dernière étude prospective randomisée, nous avons établi que les formes les plus atténuées de CDT de type Fluda/TBI étaient associées à un taux de rechute supérieur par rapport à un RIC de type Fluda/Bu/Sal (FBS) (HR= 2.49 (1.45-4.29)) (Manuscrit soumis). Bien que non différentes par rapport à l'autre bras, ce qui démontre le bon profil de tolérance de cette approche, les incidences de GVH chronique et de mortalité toxique (NRM) restent cependant trop élevées. Dans cette perspective, l'étude rétrospective monocentrique récente de 229 patients montre que l'augmentation de la dose de SAL de 1 à 2 jours s'accompagne d'une diminution significative des GVHA et GVHC extensive (HR=0.27 (0.12-0.59) et 0.24 (0.12-0.46) respectivement) sans impact négatif notable sur le contrôle de la maladie (manuscrit soumis).

Dans ces conditions, alors que la diminution de la NRM a été majeure, le contrôle tumoral reste le problème résiduel notamment pour les d'hémopathies malignes à haut risque. Revisiter l'intensité du CDT est une voie d'intérêt, l'enjeu étant de conserver le profil favorable de faible mortalité toxique.

A partir de données locales récentes d'une cohorte de 106 patients âgés ≥ 55 ans greffés à partir de donneur HLA identique familial ou non, pour des Hémopathies Myéloïdes (52 patients) et Lymphoïdes (54 patients) après un conditionnement de type F5BX2S2 (Fludarabine (30mg/m²/j x

5), Busulfan IV (130 mg/m²/ x2) et Thymoglobuline (2.5mg/Kg/j x2)), les probabilités de PFS et NRM observées à un an sont respectivement de 60% (IC95%=[50-70]) et de 20% (IC95%=[0-28]). Pour les patients ≥ 55 ans et < 64 ans (groupe1 81 patients) et les patients ≥ 65 ans (groupe2 25 patients) on a constaté aucune différence significative concernant la survie globale (OS) et la survie sans progression (PFS) à 1 et 2 ans respectivement dans les deux groupes. Ces résultats prometteurs en termes de toxicité dans une population jusque-là contre-indiquée à la greffe en raison des risques potentiels montrent que le contrôle de la maladie à long terme est devenu le principal axe de travail dans ce domaine. Concernant le contrôle de la maladie nous avons conduit une étude rétrospective à Marseille et Nantes : 166 patients (âge médian, 57 ans) atteints de maladies myéloïdes ont été traités avec fludarabine (5jours), busulfan IV (BX ou busilvex) (2 à 4j) et SAL (2j), dont 106 avec 2 jours de Busilvex. 39 de ces patients avaient une leucémie aigüe myéloïde (LAM) en première rémission complète (RC1), sans anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (groupe à risque standard) tandis que 67 patients ont été traités pour

myelodysplasie, LAM au-delà de la RC1 ou LAM en RC1 mais avec une cytogénétique de mauvais pronostic (groupe à haut risque).

La PFS à 2 ans était 60% (40-76) et 46% (32-58), dans les deux groupes respectivement.

Bien que les résultats obtenus chez les patients considérés à haut risque se comparent favorablement à ceux rapportés après un conditionnement myeloablatif standard (MAC) ou un conditionnement moins intensif, ils ne sont pas totalement satisfaisants en raison d'un taux élevé de rechute.

Ainsi, bien que la sécurité de la procédure allogénique ait été largement améliorée, affiner l'intensité du conditionnement reste bien une question importante à explorer, l'objectif étant tout en maintenant le profil de toxicité favorable, d'améliorer le contrôle à long terme des maladies.

Un récent rapport confirme que des doses plus élevées de busilvex peuvent être administrées en toute sécurité aux patients âgés ≥ 55 ans notamment en adaptant les doses à la pharmacocinétique.

Dans cette perspective nous proposons une étude prospective étudiant l'intérêt de l'intensification du F5BX4S2 par adaptation pharmacocinétique de la dose de busulfan iv. La population cible consistera en des patients porteurs d'hémopathies dont le mauvais pronostic justifiera l'alourdissement du conditionnement. Les donneurs seront des donneurs HLA identiques familiaux ou non. Tous les patients âgés de ≥ 55 ans porteurs d'hémopathies malignes de mauvais pronostic candidats à une greffe allogénique seront inclus dans cette étude, en gardant une association identique avec Fludarabine et Thymoglobuline. Un effectif de 40 patients est jugé suffisant pour estimer un taux de PFS 60% et diminuer la NRM à 1 an à 20%.

Résultats

Mohty, Mohamad, Florent Malard, Didier Blaise, Noel Milpied, Sabine Furst, Resa Tabrizi, Thierry Guillaume, et al. 2015. « Reduced-Toxicity Conditioning with Fludarabine, Once-Daily Intravenous Busulfan, and Antithymocyte Globulins Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation: Results of a Multicenter Prospective Phase 2 Trial: Reduced-Toxicity Conditioning Allo-SCT ». *Cancer* 121 (4): 562-69.

Oudin, C., P. Chevallier, S. Furst, T. Guillaume, J. E. Cheikh, J. Delaunay, L. Castagna, et al. 2014. « Reduced-Toxicity Conditioning Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Outcome in Patients with Myeloid Malignancies ». *Haematologica* 99 (11): 1762-68.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Rôle et mécanismes immunomodulateurs des NKT invariants humains après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

HERMINE Olivier - CNRS Paris

[Retour tableau](#)

Résumé

L'allogreffe est une thérapeutique potentiellement curative dans de nombreuses hémopathies malignes. L'amélioration des résultats de l'allogreffe repose sur un meilleur contrôle de l'effet délétère de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) tout en préservant le bénéfice de l'effet immunitaire anti tumoral du greffon (effet graft-versus-tumeur ou GVT). Les lymphocytes T natural killer invariants (iNKT) peuvent contrôler la GVH sans altérer l'effet GVT dans des modèles murins. Chez l'homme, deux sous-types de cellules iNKT à fonctionnalité distincte sont décrits, les iNKT CD4 positifs et les iNKT CD4 négatifs. Nous avons montré préalablement qu'une meilleure reconstitution en lymphocytes iNKT après allogreffe peut permettre dès J15 de prédire un risque significativement diminué de développement de GVH aigue et était un facteur indépendant significatif prédictif d'une amélioration de la survie globale post-greffe par diminution du risque de mortalité liée à la GVH aigue sans augmentation du risque de rechute. Sur la base de ces données, nous émettons l'hypothèse que les lymphocytes iNKT pourraient également moduler les effets GVH et GVT après allogreffe chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier in vitro puis in vivo dans un modèle murin humanisé de GVH/GVT, le rôle des différents sous types phénotypiques de lymphocytes iNKT (CD4+ versus CD4-) sur la réponse allogénique et les mécanismes par lesquels les iNKT humains peuvent moduler les effets GVH et GVT.

Les résultats attendus sont (1) la mise en évidence d'au moins un sous type iNKT (CD4+ et/ou CD4-) prépondérant dans le contrôle de la réponse allogénique (réaction mixte lymphocytaire in vitro et GVH in vivo), (2) la détermination d'un ratio régulateur/effecteurs optimal in vitro pour application in vivo, (3) l'élucidation des mécanismes d'action et leur potentielles interactions avec d'autres effecteurs immunologiques de la réponse allogénique : cellules présentatrices d'antigène (CPA) et lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+ (T regs) (4) l'optimisation de leur efficacité en recherchant le moment le plus opportun de leur administration après l'allogreffe in vivo

(enrichissement du greffon et/ou injections différées)

Les résultats obtenus devraient conduire à la proposition de nouvelles approches de thérapie cellulaire chez les patients allogreffés permettant de moduler les effets GVH et GVT.

Les méthodes utilisées pour les études in vitro des iNKT reposeront sur l'utilisation de cellules obtenues à partir de donneurs sains et mises en co-culture dans différentes situations permettant d'étudier l'effet des iNKT sur la stimulation de lymphocytes T allogéniques via des CPA avec ou sans T regs. Le modèle murin de GVH humanisée sera développé au laboratoire selon des modèles décrits. Les sous types de lymphocytes iNKT seront injectés dans ce modèle pré-clinique en combinaison avec une greffe de cellules mononuclées humaines (effet GVH) avec ou sans cellules leucémiques (effet GVT).

Résultats

Coman, Tereza, Julien Rossignol, Maud D'Aveni, Bettina Fabiani, Michael Dussiot, Rachel Rignault, Joel Babdor, et al. 2018. « Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease ». *Oncolmmunology* 7 (11): e1470735. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1470735>.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Amélioration technique de l'expansion ex vivo des cellules hématopoïétiques de sang placentaire de grade clinique (utilisée pour le protocole de recherche clinique «GRAPA»)

IVANOVIC Zoran - EFS

[Retour tableau](#)

Résumé

Dans le laboratoire R&D en Ingénierie Cellulaire de l'EFSAL, nous avons développé une procédure d'expansion ex vivo à partir des cellules CD34 de sang placentaire congelé. Ce système mis en grand volume s'avère très efficace (amplification cellulaire de 400 fois, amplification des cellules CD34+ de 60 fois et des progéniteurs engagés de 150 fois, sans perte de la capacité de greffe à court et à long terme des cellules souches. Cette technique développée à l'échelle clinique par notre laboratoire de thérapie cellulaire représente la base d'un PHRC nommé « GRAPA » qui consiste à greffer des patients adultes atteints de pathologies myélo-prolifératives en contexte allogénique (investigateur principal professeur Noël Milpied). Les résultats obtenus avec les 7 premiers patients sont très encourageants et démontrent avec un recul de presque 2 ans une reconstitution rapide et durable de l'hématopoïèse après la greffe.

Encouragés par ces résultats, nous avons envisagé la possibilité d'utiliser des Unités de Sang Placentaire (USP) rejetées à cause de leur richesse cellulaire insuffisante pour la greffe. Notre objectif est d'améliorer encore l'efficacité de notre procédure d'expansion pour qu'une USP insuffisante aujourd'hui puisse devenir un greffon valide. De même, une USP riche pourra être utilisée après son expansion ex vivo pour greffer deux patients. Pour arriver à ce but, nous proposons de compléter notre culture par deux facteurs potentiellement synergiques en termes d'amplification des progéniteurs engagés et des cellules souches :

1. Ajouter au « cocktail » une cytokine (IL-6) dont l'effet positif devrait être déclenché par notre culture qui imite l'hypoxie par plusieurs aspects
2. Ajouter du TEPA, un chélateur du cuivre, qui pourrait compléter les propriétés antioxydatives de notre milieu HP01.

Ce choix est en ligne directe avec l'idée qui nous a déjà permis de réaliser une procédure d'expansion ex vivo efficace : compensation d'une hyperoxygénation due à la culture à 20-21% d'O₂ pour faciliter l'auto-renouvellement des cellules souches (notre concept « oxygen stem cell paradigm »)

Une série d'expériences pour examiner ces 3 conditions + 1 témoin (culture actuelle) est envisagée sur 7 USP au moins. De plus, en parallèle avec une culture de durée « standard » (12 jours), une culture de durée prolongée (21 jours) sera testée pour toutes les conditions.

Les effets seront suivis au niveau des progéniteurs (cultures en méthyl-cellulose) et au niveau de 2 populations de cellules souches à court et long terme par greffe dite « primaire » et « secondaire à des souris NOG/Scid, la».)

La (les) condition(s) les plus prometteuse(s) seront transférées au grade clinique.

Résultats

Duchez, Pascale, Laura Rodriguez, Jean Chevaleyre, Veronique Lapostolle, Marija Vlaski, Philippe Brunet de la Grange, et Zoran Ivanovic. 2015. « Interleukin-6 Enhances the Activity of in Vivo Long-Term

Reconstituting Hematopoietic Stem Cells in “Hypoxic-like” Expansion Cultures Ex Vivo ». *Transfusion* 55 (11): 2684-91.

Poster



L'IL-6 augmente les capacités de reconstitution à long terme des cellules souches hématopoïétiques dans des cultures d'expansion ex-vivo conçues pour induire une réponse "similaire à l'hypoxie".

Pascale Duchez,^{1,2} Laura Rodriguez,^{1,2} Jean Chevalere,^{1,2} Veronique Conrad,^{1,2} Marija Vlaski,^{1,2} Philippe Brunet de la Grange,^{1,2} Zoran Ivanovic^{1,2}

1 Etablissement Français du Sang Aquitaine-Limousin, Bordeaux, France;
2 UMR 5164 CNRS/Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

Introduction :

Nous utilisons un milieu HRMC (Hypoxic Response Mimicking Cultures), milieu sans sérum, sans produit animal, avec anti-oxydant, supplémenté en cytokines stabilisatrices de HIF-1 α et permettant l'autorenouvellement et l'engagement des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Puisque l'IL-6 agit en synergie avec la concentration physiologique en O₂ (1%) pour maintenir les populations de CSH primitives, nous avons émis l'hypothèse que son ajout aux cultures HRMC produirait le même effet, même à la concentration atmosphérique de 20% d'oxygène.

Méthodes :

Les cellules en HRMC ont été exposées à 20% et 5% d'O₂ avec et sans IL-6. Le nombre des progéniteurs engagés (CFU-GM, BFU-E, CFU-Mix, and CFU-Mk) a été évalué ainsi que la capacité de repopulation hématopoïétique des CSH à court et à long terme en utilisant le modèle de souris NSG in vivo (greffes primaires et secondaires successivement).

Résultats :

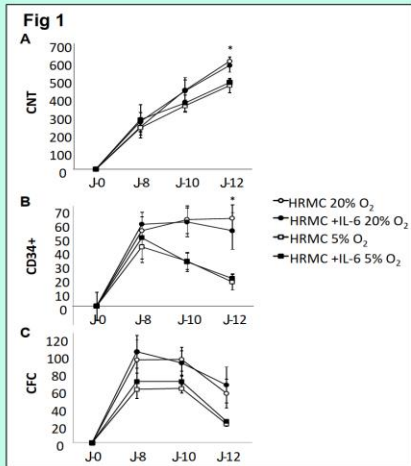


Fig. 1. Cinétique d'amplification des Cellules Nucléées Totales (CNT), des cellules CD34+ et des progéniteurs engagés (CFC) dans les cultures HRMC en fonction de la concentration en oxygène et la présence d'IL-6. HRMC = "Hypoxic Response Mimicking Culture"; "J-0, J8..." = "Jour-0, Jour-8..."; N= X-Y; * p<0.05 (Mann-Whitney test); N= 5 à 9 expériences indépendantes.

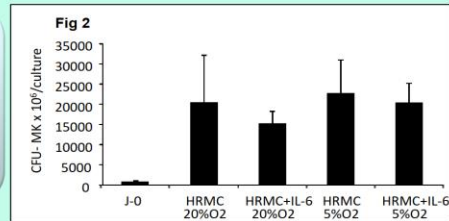
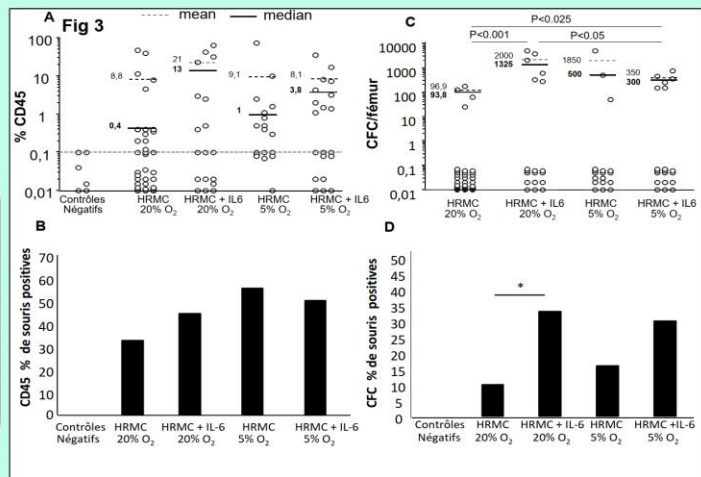


Fig. 2. Progéniteurs mégacaryocytaires dans les cultures HRMC selon la concentration en oxygène et la présence d'IL-6 : Nombre total de CFU-Mk par culture.

Fig. 3. La repopulation à long terme des cellules souches hématopoïétiques en culture à 10 jours est estimée sur la prise de greffe des cellules humaines dans la moelle des souris receveuses secondaires 8 semaines après la greffe (16 semaines après l'injection des souris primaires receveuses). A. Le chimérisme : pourcentage de cellules humaines CD45+ dans la moelle des souris. Chaque point représente une souris. La ligne en pointillée représente la limite de positivité (établie sur la base des souris qui sont conditionnées mais n'ont pas reçu de cellules le jour de l'injection). B. Fréquences de souris positives pour le CD45 humain. C. La totalité des progéniteurs hématopoïétiques humains engagés par femur i.e. Colony-Forming Cells (CFU-GM=BFU-E+CFU-Mix). *p<0.05, **p<0.001; La différence entre les valeurs est testée par le test de Mann-Whitney (seules les souris "positives" sont prises en considération). Chaque point représente une souris. D. La fréquence des souris "positives" pour les CFC d'origine humaine, les significativités sont recherchées par le test χ^2 .



L'ajout d'IL-6 aux cultures HRMC exposées à 20% d'O₂ n'a eu d'impact significatif ni sur les progéniteurs engagés ni sur la capacité de repopulation à court terme in vivo (les résultats de la greffe "primaire" des souris ne sont pas montrés). En revanche la présence d'IL-6 a amélioré à la fois la fréquence et la capacité proliférative individuelle des populations les plus primitives mises en évidence par la production de progéniteurs engagés d'origine humaine dans la moelle osseuse des souris de seconde génération.

Conclusion :

Il est possible d'améliorer encore notre procédure d'expansion basée sur les cultures HRMC exposées à une concentration atmosphérique en O₂ simplement par l'ajout d'IL-6 au cocktail de cytokines afin d'améliorer le maintien des CSH les plus primitives sans impact négatif sur la population CSH moins primitives et les progéniteurs engagés.

Année: 2012

Injection de cellules apoptotiques en allogreffe de cellules hématopoïétiques, du laboratoire au lit du patient

PERRUCHE Sylvain - EFS Besançon

[Retour tableau](#)

Résumé

Ce projet s'inscrit dans le développement de stratégies de thérapies cellulaires en particulier dans l'utilisation de leucocytes apoptotiques, à partir de travaux fondamentaux réalisés dans notre unité. Cette stratégie s'applique à l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (ACH) après conditionnement pré-greffe réduit. En effet, nous souhaitons développer un essai clinique d'injection de leucocytes apoptotiques chez les patients âgés éligibles pour une ACH déplétée en lymphocytes T et B après conditionnement pré-greffe allégé. Cette approche sera consolidée en parallèle dans un modèle animal préclinique d'allogreffe de moelle osseuse afin de valider que l'injection de leucocytes apoptotiques d'origine tierce partie (TP) favorise la prise d'un greffon déplété en lymphocytes T et B, que cette approche est compatible avec un conditionnement pré-greffe réduit de type irradiation corporelle totale 2 Gy associée à un traitement par fludarabine, et enfin, que l'injection de cellules apoptotiques « TP » ne réduit pas l'effet GvL de l'ACH ni ne favorise la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Le second aspect de ce projet est de comprendre le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans les mécanismes d'induction de tolérance dépendants des cellules apoptotiques. Nous avons pu montrer in vivo que l'injection de cellules apoptotiques induisait les pDC à favoriser une polarisation de lymphocytes T régulateurs (Treg). Le TGF- β n'est pas le seul facteur impliqué dans l'induction de Treg in vivo puisque le traitement des pDC par TGF- β recombinant favorise alors une polarisation lymphocytaire Th17. Nous souhaitons donc définir le/les facteurs impliqués (TSP-1, TSLP, MFG8...) dans cette dichotomie grâce à l'étude protéomique des surnageants de macrophages cultivés avec des cellules apoptotiques. La voie de signalisation et l'activation du TGF- β dans les pDC semblent essentielles. Nous évaluerons ces aspects à l'aide d'animaux transgéniques déficients soit en récepteur I au TGF- β soit en intégrine $\alpha\beta 8$ (permettant l'activation du TGF- β latent), respectivement. De plus, la stimulation des pDC par CpG ODN inhibe la production de TGF- β par les pDC mais pas la phosphorylation du facteur de transcription Smad2. Ceci suggère qu'un élément de la voie de signalisation du TLR9, tel qu'IRF7, interagit avec la voie des Smad et bloque leur fixation sur la région promotrice du TGF- β . Nous allons étudier ces interactions à l'aide de techniques d'immunoprécipitation (IP) mais aussi d'IP de chromatine suivi de séquençage haut débit. Enfin, bien que la co-culture de cellules apoptotiques avec les pDC ne prévienne pas leur activation par le CpG ODN, ceci n'exclut pas ces dernières n'influencent pas directement les pDC. Ainsi les molécules de reconnaissance des cellules apoptotiques seront étudiées par RT-PCR. Ce projet s'inscrit donc dans le développement de thérapies cellulaires innovantes telles que l'injection de leucocytes apoptotiques. Une fois la faisabilité de cette approche démontrée en ACH, cette stratégie pourra être appliquée à d'autres pathologies comme décrit dans différents modèles expérimentaux (arthrite, maladie de Crohn, alloimmunisation...). De plus les travaux fondamentaux de ce projet permettront d'identifier le rôle des pDC dans les mécanismes de tolérance et l'importance du TGF- β dans cette population particulière, intermédiaire entre l'agression du système immunitaire et sa réponse.

[Retour tableau](#)

Année: 2012

Rôle anti-leucémique des cellules Natural Killer médié par les KIR activateurs

RETIERE Christelle - EFS Pays de la Loire

[Retour tableau](#)

Résumé

L'implication des cellules Natural Killer (NK) alloréactives a été démontrée dans l'éradication des cellules leucémiques après greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), permettant de favoriser le pronostic clinique du receveur. Les fonctions cellulaires NK sont régulées par une balance de signaux inhibiteurs et activateurs qui impliquent de nombreux récepteurs dont les KIR, une famille de 14 gènes qui codent pour des récepteurs inhibiteurs et activateurs spécifiques des molécules HLA. C'est principalement l'alloréactivité cellulaire NK médiée par les KIR inhibiteurs qui a été étudiée dans la littérature. Cependant, les investigations sur les KIR activateurs dans le contexte de la greffe de CSH ont été menées principalement sur un plan immunogénétique. Notre objectif est donc de contribuer à une meilleure connaissance du rôle des principaux KIR activateurs dans le rôle anti-leucémique des cellules NK. Nous avons en effet contribué ces dernières années à une meilleure connaissance des ligands des KIR activateurs et mieux défini les règles d'alloréactivité qui régissent leur fonctionnement dépendant de l'environnement HLA en termes de ligands KIR. A notre connaissance, le rôle de ces KIR activateurs dans la fonction antileucémique des cellules NK n'a pas été étudié.

Notre objectif est d'étudier les fonctions cellulaires NK médiées par les principaux KIR activateurs caractérisés vis-à-vis de différentes cellules leucémiques in vitro par cytométrie de flux 4 couleurs, et ex vivo dans le contexte de la greffe de CSH.

Ce travail s'effectuera au sein de notre équipe de recherche (EFSP, EA4271) en collaboration avec les services d'hématologie du CHU de Nantes qui contribueront à nous fournir différents types de cellules leucémiques caractérisées et diagnostiquer précisément la pathologie du patient. Parallèlement à cette étude mécanistique, nous étudierons l'impact des KIR activateurs sur la rechute dans le contexte de la greffe de CSH en fonction de la nature de la leucémie. Cette étude basée sur les analyses biostatistiques sera réalisée à partir des données obtenues dans le cadre d'une étude rétrospective nationale de greffes allogéniques de CSH réalisée à partir de 254 couples donneur/receveur. Cette étude avait fait l'objet d'une publication supervisée par notre équipe (K. Gagne, BBMT 2009). Nous souhaitons ainsi revisiter les données génotypiques KIR et HLA et évaluer l'impact des KIR activateurs sur le rôle anti-leucémique. Les laboratoires participants, l'Agence de la Biomédecine ainsi que le SFGM-TC ont donné leur accord pour que ces données puissent être ré-évaluées dans cet objectif. Cette étude statistique sera menée par la société Methodomics avec laquelle nous avons précédemment collaboré. Cette étude dans son ensemble doit nous permettre de mieux évaluer l'impact anti-leucémique des KIR activateurs exprimés chez le donneur dans le contexte de la greffe de CSH au regard de la nature de la leucémie.

Résultats

David, G., Z. Djaoud, C. Willem, N. Legrand, P. Rettman, K. Gagne, A. Cesbron, et C. Retiere. 2013. « Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation ». *The Journal of Immunology* 191 (9): 4778-88.

Djaoud, Zakia, Gaëlle David, Céline Bressollette, Catherine Willem, Pauline Rettman, Katia Gagne, Nolwenn Legrand, et al. 2013. « Amplified NKG2C+ NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection

Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells ». *The Journal of Immunology* 191 (5): 2708-16.

Gagne, Katia, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Zakia Djaoud, Gaëlle David, Pauline Rettman, Céline Bressollette-Bodin, et al. 2013. « Both the Nature of KIR3DL1 Alleles and the KIR3DL1/S1 Allele Combination Affect the KIR3DL1 NK-Cell Repertoire in the French Population ». *European Journal of Immunology* 43 (4): 1085-98.

Rettman, Pauline, Catherine Willem, Gaëlle David, Raphaëlle Riou, Nolwenn Legrand, Julie Esbelin, Anne Cesbron, David Senitzer, Katia Gagne, et Christelle Retière. 2016. « New Insights on the Natural Killer Cell Repertoire from a Thorough Analysis of Cord Blood Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 100 (3): 471-79.

[Retour tableau](#)

Année: 2013

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

CHAPEROT Laurence - EFS

[Retour tableau](#)

Résumé

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

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

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

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

Résultats

Coppard, Céline, Dalil Hannani, Marion Humbert, Virginie Gauthier, Joel Plumas, Etienne Merlin, Françoise Gabert, et Laurence Chaperot. 2019. « In Vitro PUVA Treatment Triggers Calreticulin Exposition

Poster



IAB
INSTITUT
DE BIOMÉDECINE
ALPES

Potential immunogenicity of PUVA-induced cell death

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



EFS



Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

Introduction

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

Two Hypotheses...

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

- phosphatidylserine
- ADP, adenosine



ECP-induced cell death promotes anti-T cell response.
 → T cell lymphoma
DAMPs associated with apoptotic cells are :

- Calreticulin (CRT)
- HMGB1-ox
- ATP
- Hsp70/90

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

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

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

Does ECP induce an Immunogenic cell death?

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

CRT is an endogenous chaperone protein that resides in endoplasmic reticulum lumen (ER) where it has a calcium regulatory functions, in physiological conditions. Following ER stress, the protein eIF2α is phosphorylated and permits the exposition of CRT at cell surface (ecto-CRT). In the plasmatic membrane, CRT has an immunomodulatory function, as it acts as a « eat-me » signal promoting phagocytosis. Ecto-CRT has a key role in immunogenic cell death (Hannani; cancer journal.2011). The modulation of CRT expression following PUVA treatment was evaluated on T cells. PUVA induces ecto-CRT expression. The expression of ecto-CRT is higher on activated T cells treated by PUVA than on untreated or resting T-cells.



24h **48h**

Flow cytometry plots show CRT expression (y-axis) vs CD3 (x-axis) for Resting T cells (NT, PUVA) and Activated T cells (NT, PUVA) at 24h and 48h. The graph shows CRT (%) on the y-axis (0-80) and Time (h) on the x-axis (0, 24, 48). Legend: Resting T cells NT (black circle), Resting T cells PUVA (black square), Activated T cells NT (black triangle), Activated T cells PUVA (black diamond).

2) PUVA-treated activated T cells release HMGB1

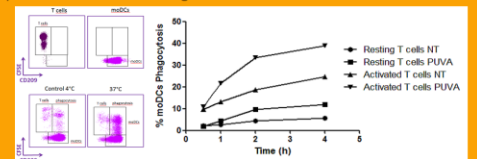
High mobility group box 1 protein (HMGB1) is an important nuclear chromatin protein. In physiological conditions, it is localized in the nucleus, but during necrosis and late-apoptosis HMGB1 is released by dying cells. Extracellular HMGB1 acts as an alarmin and promotes DC maturation. The release of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



Dot plots show HMGB1 (ng/ml) on the y-axis (0-100) and Time (h) on the x-axis (24, 48). Legend: Resting T cells (black circle), Resting T cells PUVA (black square), Activated T cells (black triangle), Activated T cells PUVA (black diamond).

3) MoDCs phagocytose PUVA-treated activated T cells.

Since CRT is highly exposed on the cell surface of PUVA-treated cells, we wanted to know if monocyte-derived dendritic cells (moDCs) were able to phagocytose activated T cells treated by PUVA. We co-incubated autologous moDC and PUVA-treated or untreated T cells. We observed that moDCs preferentially phagocytose activated T cells treated by PUVA compared to untreated and resting T cells.



Flow cytometry plots show CD3 (y-axis) vs CD209 (x-axis) for T cells and moDCs. The graph shows % moDCs Phagocytosis on the y-axis (0-80) and Time (h) on the x-axis (0, 1, 2, 4, 8). Legend: Resting T cells NT (black circle), Resting T cells PUVA (black square), Activated T cells NT (black triangle), Activated T cells PUVA (black diamond).

4) MoDCs mature in contact with activated T cells

Since immunogenic cell death promotes DC maturation, we assessed if PUVA-treated T cells induce DC maturation. Monocyte-derived dendritic cells (moDCs) mature more in contact with activated T cells and express more CD40 and CD80 than when in contact with resting T cells. Similar results have been obtained when T cells have been co-cultured with monocytes or macrophages.



Bar graphs show MoDCs CD40 expression (y-axis, 0-10) and MoDCs CD80 expression (y-axis, 0-8) on the y-axis and Purified T cells on the x-axis. Legend: MoDCs (black bar), Resting T cells (white bar), Resting T cells PUVA (grey bar), Activated T cells (white bar), Activated T cells PUVA (grey bar).

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

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



Conclusions and perspectives

Our results show that PUVA induces the up-regulation of Calreticulin at the surface of treated cells. We show that PUVA-treated activated alloreactive T cells produce higher levels of DAMPs than resting T cells. The ecto-CRT expression is associated with the release of HMGB1 but not ATP (not shown). PUVA-treated resting T cells are poorly engulfed by MoDCs and do not trigger their maturation. Conversely MoDCs efficiently engulf apoptotic activated alloreactive T cells and mature when in contact with them. These results suggest that PUVA-induced cell apoptosis could be an immunogenic process. Since CIA model recapitulates human setting, depletion of different cell populations (among treated cells or in the treated mice) will be performed to identify which cells are responsible for the ECP clinical effect.

Année: 2013

Personnes issues de l'immigration à Marseille et Enrichissement de la banque de sang placentaire

DI CRISTOFARO Julie - Université Aix-Marseille

[Retour tableau](#)

Résumé

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

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

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

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

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

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

Résultats

Bordoni, C, J Magalon, C Gilbertas, M Gamberre, P Le Coz, M Berthomieu, C Chabannon, J Di Cristofaro, et C Picard. 2015. « Cord blood collection and banking from a population with highly diverse geographic

origins increase HLA diversity in the registry and do not lower the proportion of validated cord blood units: experience of the Marseille cord blood bank ». Bone Marrow Transplantation 50 (4): 531-35.

Poster

Appel d'offres

L'origine géographique et l'enrichissement de la banque de sang placentaire ne sont pas corrélés avec les critères de qualification des USP à la banque de Marseille

C. Bordoni¹, J. Magalon², C. Gilbertas³, M. Gamerre³, M. Berthomieu⁴, C. Chabannon⁴, J. Di Cristofaro¹, C. Picard^{1,2}

¹UMR7268 ADES AMU CNRS EFS, Marseille; ²Laboratoire d'immunogénétique, Etablissement Français du Sang Alpes Méditerranée; ³Maternité, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille; ⁴Unité de thérapie cellulaire, Institut Paoli-Calmettes, Marseille

Objectifs

En plus du contenu en cellule des unités de sang placentaire, un problème majeur pour la mise en banque des USP, soulevé par plusieurs auteurs, est dans l'enrichissement en diversité du registre HLA. Ceci implique que les USP doivent être collectées dans des maternités caractérisées par une diversité d'origine géographique des femmes qui y accouchent. Une étude précédente, menée sur 328 USP de la maternité de Marseille, a montré que 60% des USP avait au moins un haplotype d'origine non-Européenne et que 92% et 59% de ces USP enrichissaient les registres de sang de cordon et de moelle osseuse.

Il n'y avait aucune différence pour les standards de qualification (volume, TNCC, et CD34⁺) concernant l'enrichissement du registre ou l'origine de l'haplotype. Cependant, plusieurs études à partir de banque d'USP américaine suggèrent que l'éthnicité affecte la proportion d'USP ayant une numération cellulaire élevée.

Le but de notre étude était de déterminer si, dans notre contexte local, l'origine géographique et l'enrichissement du registre sont corrélés avec les critères de qualification des USP.

Méthodologie

Population étudiée: Etude menée à la maternité de Marseille entre Mars 2012 et Août 2013, incluant:

- 106 USP disqualifiées (dUSP) avec un TNCC < 140x10⁷,
- 136 USP qualifiées,
- 2691 donneurs non-apparentés provenant de la même zone géographique.

Les volumes d'USP (mL) ont été enregistrés à la maternité. Le TNCC a été réalisé sur les USP avant « techniquage » et congélation en utilisant un analyseur hématologique.

Origine des haplotypes putatifs: Le génotypage semi-allélique HLA-A, HLA-B et allélique HLA-DRB1 a été réalisé.

Pour déduire l'information sur l'origine ancestrale des USP banquées ou des dUSP et leur potentiel d'enrichissement de la diversité HLA, nous avons appliqué un algorithme qui permet de déterminer les haplotypes putatifs des parents.

L'origine des USP et des dUSP a été déduite en confrontant leur haplotype avec les données disponibles et publiées par Maïers et collaborateurs en 2007.

Enrichissement des registres: L'enregistrement des registres internationaux de donneurs non-apparentés et d'USP a été évaluée en utilisant la base de données internationale des donneurs de moelle osseuse en simulant la recherche d'un receveur potentiel. Une USP était considérée comme enrichissant le registre avec un phénotype non-référencé quand aucune correspondance 6/6 avec une USP ou un donneur non-apparenté était identifiée dans les registres respectifs, en considérant une résolution semi-allélique pour le HLA-A, HLA-B et allélique pour le HLA-DRB1.

Résultats

71% des dUSP et 75% des USP présentaient 2 haplotypes non-européens.

Les dUSP et les USP enrichissaient les registres d'USP et de moelle osseuse dans la même proportion (73.6% et 26.5% vs 62.5% et 24.3%, respectivement, p=NS).

Pas de différence statistique observée pour les critères de qualification entre toutes les dUSP présentant 2 haplotypes d'origine européenne et au moins 1 haplotype d'origine non-européenne, ni pour l'enrichissement du registre.

dUSP	Registre USP				Origine géographique					
	Enrichissante (78)		Non-enrichissante (28)		2 européenne (18)		≥1 non-européenne (88)			
Critères de qualification	mooyenne	SD	mooyenne	SD	mooyenne	SD	mooyenne	SD		
Volume avant congélation (mL)	88	69-145	90	70-135	83,4	69-97	90,2	69-145		
Numération TNC avant congélation (x10 ⁷)	105	65-137	105	66-137	104	66-136	105	56-137		
Répartition TNC	n	f(%)	n	f(%)	p	n	f(%)	n	f(%)	p
56-90 x10 ⁷	20	25,6	6	21	0,66	5	28	21	24	0,73
90-105	20	25,6	6	21	0,66	4	22	22	25	0,8
105-124	16	20,5	30	36	0,11	5	28	21	24	0,73
124-137	21	26,9	6	21	0,67	4	22	23	26	0,73
Inconnu	1	1,3	0	0	0	0	1	1,1		

Conclusions

Notre étude suggère que le nombre d'USP mises en banque n'est pas affecté par l'origine géographique de l'haplotype dans la région de Marseille. Ainsi, l'augmentation de la diversité en HLA du registre ne se fait pas au dépens de la qualité des USP ou des taux de validation.

Le contexte génétique local et aussi le mode de prélèvement des USP peuvent expliquer les différences observées avec les autres études.



Année: 2013

Biomarqueurs épigénétique en greffe de cellules souches hématopoïétiques : implication dans les complications post-greffe

GOODHARDT Michele - Université Paris Diderot

[Retour tableau](#)

Résumé

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

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

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

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

Résultats

Djegloul, Dounia, Klaudia Kuranda, Isabelle Kuzniak, Daniela Barbieri, Irina Naguibneva, Caroline Choisy, Jean-Christophe Bories, et al. 2016. « Age-Associated Decrease of the Histone Methyltransferase SUV39H1 in HSC Perturbs Heterochromatin and B Lymphoid Differentiation ». Stem Cell Reports 6 (6): 970-84.

[Retour tableau](#)

Année: 2013

Une thérapie cellulaire T adoptive dans la greffe des cellules hématopoïétiques souche de sang placentaire

MALLONE Roberto - INSERM Paris

[Retour tableau](#)

Résumé

OBJECTIFS.

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

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

METHODOLOGIE.

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

RESULTATS ATTENDUS.

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

Résultats

Kuranda, Klaudia, Sophie Caillat-Zucman, Sylvaine You, et Roberto Mallone. 2019. « In Vitro Expansion of Anti-viral T Cells from Cord Blood by Accelerated Co-cultured Dendritic Cells ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 13 (juin): 112-20.

Brevet : Mallone, Roberto, Sophie CAILLAT-ZUCMAN, et Klaudia KURANDA. 2016. Procédés de préparation de cellules t spécifiques de l'antigène à partir d'un échantillon de sang de cordon ombilical. World Intellectual Property Organization WO2016180852A1, filed 11 mai 2016, et issued 17 novembre 2016. <https://patents.google.com/patent/WO2016180852A1/fr>.

[Retour tableau](#)

Année: 2014

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

BENSOUSSAN Danièle - CHU de Nancy

[Retour tableau](#)

Résumé

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

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

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

Résultats

Qian, C., Y. Wang, L. Reppel, M. D'aveni, A. Campidelli, V. Decot, et D. Bensoussan. 2018. « Viral-Specific T-Cell Transfer from HSCT Donor for the Treatment of Viral Infections or Diseases after HSCT ». *Bone Marrow Transplantation* 53 (2): 114-22.

Année: 2014

Potentiel anti-leucémique des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon.

Application en double-greffe de sang de cordon

GAGNE Katia - EFS Pays de la Loire

[Retour tableau](#)

Résumé

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

Résultats

Manianguou, Bercein, Christelle Retière, et Katia Gagne. 2018. « Next-Generation Sequencing Technology a New Tool for Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor Allele Typing in Hematopoietic Stem Cell Transplantation : Séquençage Nouvelle Génération, Un Nouvel Outil Pour Typer Les Allèles Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor En Greffes de Cellules Souches Hématopoïétiques ». *Transfusion Clinique et Biologique* 25 (1): 87-89.

Rettman, P., F. Malard, N. Legrand, O. Avinens, J.-F. Eliaou, C. Picard, A. Dormoy, et al. 2016. « Impact of KIR[[Sol]]HLA Genetic Combinations on Double Umbilical Cord Blood Transplantation Outcomes. Results of a French Multicentric Retrospective Study on Behalf of the Société Francophone de Greffe de

Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and the Société Francophone D'Histocompatibilité et D'Immunogénétique (SFHI) ». *Bone Marrow Transplantation* 51 (11): 1499-1503.

Rettman, Pauline, Catherine Willem, Christelle Volteau, Nolwenn Legrand, Patrice Chevallier, Laurence Lodé, Julie Esbelin, et al. 2016. « Impact of Graft-versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation ». *Transplantation*, octobre.

Poster

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

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

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

INTRODUCTION

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

RESULTATS

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

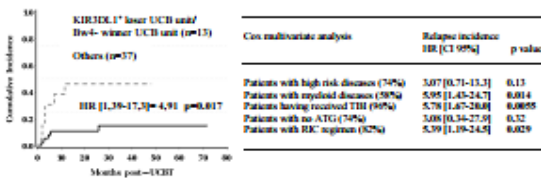


Figure 1 et Table 1: Combinaison génétique « cordon perdant KIR3DL1/cordon gagnant Bw4 » et incidence de rechute post-dUCBT (N=50)

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

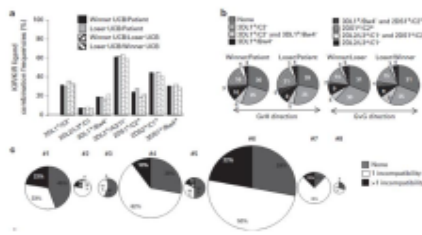


Figure 2 : Combinaisons génétiques KIR/HLA et incidence de rechute post-dUCBT (n=293)

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

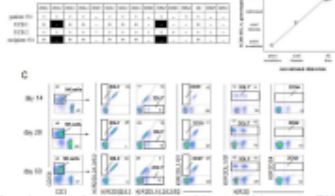


Figure 3: Détermination précoce du chimérisme hématopoïétique post-dUCBT avec les gènes KIR

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

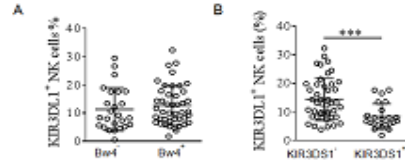


Figure 4 : Impact du génotype KIR mais pas de l'environnement autologue HLA-Bw4 sur la formation du répertoire des cellules NK KIR3DL1+ de sang de cordon

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

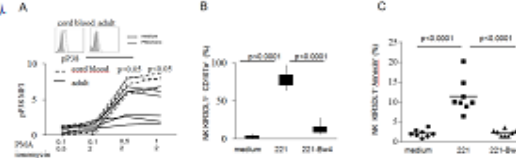


Figure 5: Les cellules NK de sang de cordon ont des capacités d'activation et de dégranulation ex-vivo entraînant potentiellement leur mort par apoptose

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

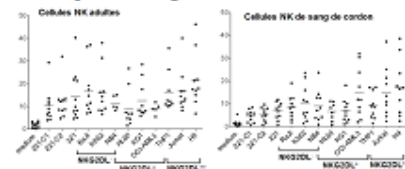


Figure 6 : Potentiel anti-leucémique des cellules NK de donneurs de sang adultes (n=11) et de cordons (n=10) de génotype KIR AA évalué en termes de fréquence de cellules NK CD107a+ contre différentes lignées 721.221 et lignées leucémiques

CONCLUSIONS

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

Année: 2014

Optimisation et sécurisation de la greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir d'iPSCs humaines

MOREAU-GAUDRY François - Biothérapie et cancer, Université Bordeaux

[Retour tableau](#)

Résumé

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

1. L'échec de la greffe des cellules souches hématopoïétique (CSH) dérivées d'iPSCs in vivo. De nombreux laboratoires, dont le nôtre, ont réussi à dériver des iPSCs humaines en cellules hématopoïétiques in vitro. Cependant, aucune équipe n'a rapporté une reconstitution efficace in vivo d'une hématopoïèse dans des souris humanisées immunodéficientes à partir de ces cellules.
2. Le risque de formation de tératome à partir d'iPSCs résiduelles persistant dans le greffon. Ce risque n'a jamais été évalué pour une application en hématologie après administration intraveineuse du greffon.

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

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

Résultats

Bedel, Aurelie, François Beliveau, Isabelle Lamrissi-Garcia, Benoit Rousseau, Isabelle Moranvillier, Benoit Rucheton, Veronique Guyonnet-Dupérat, et al. 2017. « Preventing Pluripotent Cell Teratoma in Regenerative Medicine Applied to Hematology Disorders: Evaluation and Control of Teratoma Risk in Hematology ». STEM CELLS Translational Medicine 6 (2): 382-93. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0201>.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

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

CANQUE Bruno - UMR Inserm/UPVII/EPHE 1126

Institut Univ d'hémato Centre Hayem Hôpital St Louis

[Retour tableau](#)

Résumé

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, granulomacrophagique 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.

Résultats

Alhaj Hussien, Kutaiba, Thien-Phong Vu Manh, Fabien Guimiot, Elisabeth Nelson, Emna Chabaane, Marc Delord, Maxime Barbier, et al. 2017. « Molecular and Functional Characterization of Lymphoid Progenitor Subsets Reveals a Bipartite Architecture of Human Lymphopoiesis ». *Immunity* 47 (4): 680-696.e8.

Keita, Seydou, Samuel Diop, Shalva Lekiasvili, Emna Chabaane, Elisabeth Nelson, Marion Strullu, Chloé Arfeuille, et al. 2023. « Distinct subsets of multi-lymphoid progenitors support ontogeny-related changes in human lymphopoiesis ». *Cell Reports* 42 (6): 112618.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

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

D'AVENI Maud - Unité thérapie cellulaire et tissus

CHU Nancy

[Retour tableau](#)

Résumé

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.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

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

GUILLONNEAU Carole - INSERM UMR Nantes

[Retour tableau](#)

Résumé

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+CD45RC_{low} 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+CD45RC_{low} 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 déplétant 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).

Résultats

Brevet: GUILLONNEAU, Carole, Ignacio ANEGON, et Séverine BEZIE. 2018. Subpopulation of cd8+cd45rc_{low} tregs and uses thereof. United States US20180251731A1, filed 6 septembre 2016, et issued 6 septembre 2018.
<https://patents.google.com/patent/US20180251731A1/en?q=Tolerance&q=france&q=organ+transplantation+nanter&q=nantes&q=Tolerance+france+organ+transplantation+nantes>.

Picarda, Elodie, Séverine Bézie, Laetitia Boucault, Elodie Autrusseau, Stéphanie Kilens, Dimitri Meistermann, Bernard Martinet, et al. 2017. « Transient Antibody Targeting of CD45RC Induces Transplant Tolerance and Potent Antigen-Specific Regulatory T Cells ». JCI Insight 2 (3).

Vimond, Nadège, Juliette Lasselin, Ignacio Anegon, Carole Guillonnet, et Séverine Bézie. 2021. « Genetic engineering of human and mouse CD4+ and CD8+ Tregs using lentiviral vectors encoding

chimeric antigen receptors ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 20 (mars): 69-85. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.008>.

Besnard, Marine, Céline Sérazin, Jason Ossart, Anne Moreau, Nadège Vimond, Léa Flippe, Hanna Sein, et al. 2022. « Anti-CD45RC Antibody Immunotherapy Prevents and Treats Experimental Autoimmune Polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal Dystrophy Syndrome ». *Journal of Clinical Investigation* 132 (7). <https://doi.org/10.1172/JCI1156507>.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

Réalisation des greffons hématopoïétiques à partir de cellules CD34+ récupérées par cytophérèse sans mobilisation et amplifiées ex vivo

IVANOVIC Zoran - Laboratoire R&D EFS Aquitaine Limousin, Bordeaux

[Retour tableau](#)

Résumé

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) cytophérése(s) simple(s), 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.

Résultats

Lapostolle, Véronique, Jean Chevaleyre, Pascale Duchez, Laura Rodriguez, Marija Vlaski-Lafarge, Ioanna Sandvig, Philippe Brunet de la Grange, et Zoran Ivanovic. 2018. « Repopulating Hematopoietic Stem Cells from Steady-State Blood before and after Ex Vivo Culture Are Enriched in the CD34+CD133+CXCR4low Fraction ». *Haematologica* 103 (10): 1604-15.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

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

LAUNAY David - EA2686 Labo d'immuno

Faculté de médecine

Pôle recherche, Lille

[Retour tableau](#)

Résumé

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.

[Retour tableau](#)

Année: 2015

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

ROBIN Marie - Sce hémato greffe hôpital St Louis Paris

[Retour tableau](#)

Résumé

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 rapides 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 incriminer comme induisant un déficit immunitaire favorisant les infections opportunistes (toxoplasmose, pneumocytose...)(Goldberg, Reichel et al. 2013; Wysham, Sullivan et al. 2013)
- (4) corrélér 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.

Résultats

Robin, Marie, Raphael Porcher, Corentin Orvain, Jacques-Olivier Bay, Fiorenza Barraco, Anne Huynh, Amandine Charbonnier, et al. 2021. « Ruxolitinib before Allogeneic Hematopoietic Transplantation in Patients with Myelofibrosis on Behalf SFGM-TC and FIM Groups ». Bone Marrow Transplantation 56 (8): 1888-99. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01252-7>.

[Retour tableau](#)

Année: 2017

Aspects épigénétiques du développement hématopoïétique dans l'espèce humaine

CANQUE Bruno - INSERM/UPVII/EPHE 1126

Hôpital Saint-Louis

[Retour tableau](#)

Résumé

Ce programme de recherche porte sur les étapes précoces du développement lymphoïde dans l'espèce humaine. Nous abordons cette problématique à travers l'utilisation d'un modèle original d'hématopoïèse humaine chez la souris immunodéficiente développé au laboratoire, le modèle NSG-UCB. Ce modèle a permis d'établir une nouvelle cartographie développementale de l'hématopoïèse humaine à travers l'identification d'une duplication des axes de développement lymphoïde qui semble par ailleurs être conservée chez les rongeurs. Ces travaux nous conduisent à proposer un nouveau modèle d'ontogénie lymphoïde fondé sur l'existence de deux familles de progéniteurs dotées de potentiels et de caractéristiques moléculaires et fonctionnelles spécifiques.

L'objectif de ce programme de recherche est de poursuivre notre exploration des bases moléculaires du développement lymphoïde qui seront abordées à la fois dans leur composante intrinsèque à travers le criblage fonctionnel de gènes candidats, et dans leur composante extrinsèque, à travers le développement d'un système de micro-culture ex vivo de cellules de MO respectant les interactions cellules-cellules.

Les résultats des travaux réalisés sur le modèle NSG-UCB nous placent en outre dans les meilleures conditions pour établir une cartographie épigénétique des étapes précoces du développement lymphoïde en suivant de façon dynamique les remaniements de la chromatine, ainsi que l'évolution du profil de méthylation de l'ADN survenant entre le stade de cellule souche hématopoïétique et celui de précurseur lymphoïde T, B et NK/ILC.

[Retour tableau](#)

Année: 2017

Greffes de cellules souches hématopoïétiques dérivées d'iPSCs humaines

MOREAU-GAUDRY François - INSERM U1035: Biothérapies des maladies génétiques inflammatoires et cancer, Bordeaux

[Retour tableau](#)

Résumé

La découverte des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) est une révolution dans tous les domaines de la greffe. En hématologie, la preuve de principe que les iPSCs pouvaient donner naissance in vitro à une hématopoïèse fonctionnelle par plusieurs équipes dont la nôtre (Bedel, Am J Hum Genet 2012). Nous avons également montré que les iPSCs constituaient un outil pertinent pour la modélisation des hémopathies (Charaf, Leukemia 2016). Les iPSCs pourraient constituer une source théoriquement illimitée de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues spécifiques pour le patient en l'absence d'un donneur HLA compatible. Néanmoins, Il nous est apparu évident que le risque de formation de tératomes à partir d'iPSCs résiduelles persistant dans le greffon pouvait être un danger. Pour y remédier, nous avons donc développé un système efficace pour prévenir ce risque (Bedel, Stem cell and translational med 2016). Le deuxième obstacle des iPSCs en hématologie réside dans la très faible capacité de greffe des CSHs dérivées d'iPSCs dans des souris immunodéficientes NSG. Deux hypothèses pourraient expliquer ces greffes non optimales : soit l'antigène de surface CD34+ qui est l'antigène de référence pour la cellule souche adulte ou foetale n'est pas approprié pour sélectionner les CSHs dérivées d'iPSCs beaucoup plus immatures soit les protocoles de différenciation ne sont pas suffisamment optimisés et ne récapitulent pas les processus du développement. Pour surmonter ce défi, nous avons récemment développé un vecteur lentiviral innovant, n'activant son gène rapporteur que dans les CSHs et progéniteurs immatures. Nous souhaitons achever l'optimisation de ce vecteur puis évaluer son potentiel pour détecter les « véritables cellules souches » après greffe, en évaluant leur richesse en SRC (SCID-repopulating cells). Nous pourrions déterminer la signature phénotypique et moléculaire rigoureuse des cellules dérivées d'iPSCs exprimant ce rapporteur après différenciation hématopoïétique. Le deuxième intérêt de ce vecteur « HSC-spécifique » sera de déterminer les meilleures conditions expérimentales de différenciation hématopoïétiques in vitro permettant la plus forte activation de ce rapporteur. Nos recherches s'orienteront vers la mise au point de cultures 3D dans des matrices « type hydrogel » avec coculture de cellules endothéliales et/ou stromales pour simuler la niche dans les conditions de l'ontogénèse humaine. Enfin des greffes de CSHs dérivées d'iPSC exprimant le vecteur rapporteur seront réalisées dans les souris NSG. Ainsi, ce projet devrait pouvoir contribuer à améliorer grandement la greffe de CSHs dérivées des iPSCs, prérequis indispensable à une translation clinique. Enfin, de façon plus théorique, la caractérisation des CSHs basées sur d'autres critères que les classiques antigènes de surface pourrait peut-être permettre d'identifier à une sous population cellulaire de cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles in vivo.

Résultats

Cullot, Grégoire, Julian Boutin, Jérôme Toutain, Florence Prat, Perrine Pennamen, Caroline Rooryck, Martin Teichmann, et al. 2019. « CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations ». Nature Communications 10: 1136.

Prat, Florence, Jérôme Toutain, Julian Boutin, Samuel Amintas, Grégoire Cullot, Magalie Lalanne, Isabelle Lamrissi-Garcia, et al. 2020. « Mutation-Specific Guide RNA for Compound Heterozygous Porphyria On-Target Scarless Correction by CRISPR/Cas9 in Stem Cells ». Stem Cell Reports 15 (3): 677-93.

Bedel, A., J. Boutin, S. Amintas, I. Lamrissi-Garcia, B. Rousseau, S. Poglio, P. Brunet de la Grange, et al. 2021. « Spleen Route Accelerates Engraftment of Human Hematopoietic Stem Cells ». Biochemical and Biophysical Research Communications 569 (septembre): 23-28.

[Retour tableau](#)

Année: 2017

Incidence et description de la GvH chronique dans la population d'enfants et adolescents greffés inclus dans la cohorte LEA

oudin Claire - EA 3279: Santé publique et maladies chroniques:

Hématologie Oncologie Pédiatrique

Marseille

[Retour tableau](#)

Résumé

Chaque année en France, environ 150 patients de moins de 18 ans reçoivent une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour une pathologie maligne de mauvais pronostic (essentiellement leucémies aigües).

En dépit de l'amélioration des techniques de greffe, l'allogreffe de CSH reste grevée de morbi-mortalité en lien avec la maladie du greffon contre l'hôte (GvH). Il s'agit d'une réaction dysimmunitaire conduite essentiellement par les lymphocytes du donneur qui littéralement « mal reçus » et mal orientés au moment de la greffe par les cellules présentatrices d'antigène du patient vont développer une agressivité à l'encontre des tissus du greffé.

La GvH peut se développer sur un mode aigu, puis sur un mode chronique avec des modalités d'expression très pléomorphes. Anciennement, il était d'usage de parler de GvH aiguë (GvHa) dans les 100 premiers jours de la greffe puis de GvH chronique au-delà (GvHc). La nouvelle classification du National Institutes of Health américain a redéfini ces 2 formes de GvH non plus chronologiquement mais en fonction des tissus lésés et du type de lésions. Si la GvHa reste une complication grave, elle est en pédiatrie bien décrite, et sa prise en charge initiale assez consensuelle. Il n'en va pas de même avec la GvHc. La GvHc met plus rarement le pronostic vital du patient en jeu, mais peut être extrêmement invalidante tant d'un point de vue fonctionnel (enraidissements, peau cartonnée, syndrome sec sévère, insuffisance respiratoire) que d'un point de vue social. Si l'incidence de la GvHc dans la population greffée pédiatrique est moindre que chez les adultes, la GvHc reste mal connue et mal décrite en pédiatrie.

Un état des lieux au sein d'une cohorte homogène de patients pédiatriques paraît donc indispensable, afin d'en mieux connaître l'incidence, les modalités d'expression (chronologie, organes touchés...), la sévérité et les répercussions (fonctionnelles, psycho-sociales et professionnelles). Il est également important d'en décrire les modalités de prise en charge, en l'absence de consensus actuel.

La cohorte LEA (Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent) a été créée en 2004, et regroupe aujourd'hui 16 centres français d'hématologie pédiatrique. Son objet est le suivi à long terme des patients traités pour leucémie aiguë dans l'enfance. Son originalité est qu'outre les questionnaires de qualité de vie, remplis par les patients et les familles, les sujets inclus bénéficient au cours de consultations spécifiques d'exams cliniques et paracliniques systématiques en vue de déterminer l'existence de séquelles tardives. A ce jour plus de 3700 enfants et adolescents ont été inclus dont plus de 900 patients allogreffés.

Nous souhaitons enrichir le suivi des patients greffés de la cohorte LEA par une étude portant spécifiquement sur la GvHc.

En 2017 et 2018, chaque consultation LEA protocolaire chez un patient greffé (la 1ère à 2 ans du diagnostic initial pour les leucémies greffées en 1ère rémission complète (RC) et à 4 ans du diagnostic pour les leucémies greffées en 2ème RC ou plus, puis tous les 2 ans) sera enrichie par une évaluation de la GvHc, à l'aide d'un questionnaire clinique détaillé adapté des documents diffusés par le Fred Hutchinson Cancer Research (Seattle, Wa, USA). Ceci permettra de définir précisément l'incidence de la GvHc

pédiatrique, sa sévérité, ses modalités d'expression, de prise en charge, et son retentissement sur la qualité de vie (questionnaire standardisé).

Ceci permettra secondairement l'élaboration d'une ou plusieurs études portant sur la prise en charge spécifique de la GvHc en pédiatrie.

[Retour tableau](#)

Année: 2018

Signature génique et métabolique des cellules souches hématopoïétiques cultivées à basses concentrations d'oxygène

BRUNET DE LA GRANGE Philippe - Laboratoire R&D d'Ingénierie Cellulaire (EFS-Nouvelle Aquitaine)
– Equipe Cellules Souches Normales et

Leucémiques - INSERM U1035, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoire et du Cancer (BMGIC) – Université de Bordeaux

[Retour tableau](#)

Résumé

La compréhension des mécanismes de régulation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques (CSH et PH) et la détermination de leurs besoins spécifiques en culture sont capitales afin de perfectionner les protocoles d'expansion des greffons hématopoïétiques et d'apporter à ces cellules des conditions d'expansion optimales. Une expansion classique réalisée à 20% d'O₂ (concentration atmosphérique) induit la différenciation des CSH et donc leur perte. Dans ce contexte il est primordial de potentialiser l'effet des basses concentrations d'O₂ observé sur le maintien et/ou l'autorenouvellement en culture des CSH, et d'en déterminer les mécanismes mis en œuvre lors de ces cultures. C'est pourquoi nous proposons d'étudier, par une approche directe sur des populations hautement enrichies en CSH humaines (cellules « Side Population » (SP) en combinaison avec des antigènes membranaires), les effets des basses concentrations d'O₂ sur l'expression de gènes et le métabolisme énergétique.

Les cellules SP/CD34+CD38low/neg (±CD133 ±CD90) du sang périphérique en homéostasie seront triées puis cultivées à des concentrations décroissantes d'O₂ (de l'hyperoxie (20%) jusqu'aux valeurs physiologiques (13-0,1%)) pour étudier l'activation ou la répression de gènes selon le niveau d'oxygénation cellulaire par une analyse du transcriptome. Dans le cas particulier du sang périphérique en homéostasie, la comparaison des profils d'expression entre des CSH fraîchement isolées (ayant une très faible capacité de greffe) et des cellules cultivées (qui augmentent cette capacité de greffe) nous permettra de mettre en évidence des gènes impliqués dans la régulation du potentiel de greffe des CSH ce qui, sur le plan fondamental, permettra de comprendre la physiologie des cellules souches, et sur le plan clinique d'ouvrir la voie au contrôle de populations avec capacité de greffe en agissant directement sur ces gènes (transfert de gènes ou utilisation de substances chimiques). Par ailleurs, nous étudierons le métabolisme énergétique des SP/CD34+CD38low/neg (±CD133 ±CD90) et notamment les besoins en glucose (sonde 2NBDG), le contenu en mitochondries (sonde Mitotracker et qPCR), l'activité mitochondriale (mesure du potentiel de membrane mitochondriale, sonde TMRM), ainsi que le contenu intracellulaire en Reactive Oxygen Species (ROS) (sondes MitoSox et CellRox). Ces mesures seront réalisées par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de sondes métaboliques couplées à des fluorochromes. Dans ce contexte, le traitement des cellules avec des inhibiteurs de la synthèse d'ATP mitochondriale, de la glycolyse ou de la βoxydation des acides gras, sera également réalisé afin de préciser les mécanismes mis en jeu. Cette étude sera complétée par une analyse directe de la voie énergétique préférentiellement utilisée par les cellules vivantes (quantification simultanée de la respiration mitochondriale et de la glycolyse en temps réelle) grâce à la technologie Seahorse XF.

[Retour tableau](#)

Année: 2018

Etude du rôle physiologique de la sérotonine dans l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

HERMINE Olivier - Unité Inserm U1163 – Institut Imagine – Equipe Olivier Hermine "Cellular and molecular basis of normal hematopoiesis and hematological disorders : therapeutic implications"

[Retour tableau](#)

Résumé

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a révolutionné le traitement de nombreuses hémopathies malignes en permettant une récupération hématologique après chimiothérapie intensive. Ce traitement est cependant toxique, notamment en raison des complications pouvant survenir pendant la période d'aplasie post-chimiothérapie. Limiter la période d'aplasie permet de diminuer la durée d'hospitalisation, les besoins transfusionnels, et le risque d'infection¹. Pour ce faire, les principales solutions utilisées sont l'utilisation de facteurs de croissance tels que le G-CSF, ainsi que la greffe d'un nombre minimum de CSH CD34+2.

La plupart des autogreffes et près des 3/4 des allogreffes de CSH sont réalisées avec des CSH recueillies dans le sang périphérique après mobilisation. Il est donc important de mobiliser correctement les donneurs, afin d'obtenir une quantité de CSH suffisante à la greffe. Or, jusqu'à 30% des donneurs sains ou patients sont en échec d'une mobilisation standard par G-CSF, et parmi ces patients, 30% ne répondent pas non plus au plerixafor (inhibiteur de l'axe CXCR4/CXCL12)³.

Trouver un facteur permettant une meilleure mobilisation des CSH et/ou une sortie d'aplasie plus rapide après autogreffe de CSH représenterait un progrès majeur dans la prise en charge de nombreux patients porteurs d'une hémopathie maligne.

En nous basant sur la littérature, nos travaux récents dans l'érythropoïèse ainsi que des données préliminaires de ce projet, nous proposons que la sérotonine puisse agir sur les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques. En effet, dans une cohorte rétrospective de patients traités par autogreffe de CSH, nous avons observé une sortie d'aplasie plus précoce chez les patients traités par un inhibiteur de recapture de la sérotonine (IRS) lors de l'autogreffe. En parallèle, nous avons observé que l'utilisation d'IRS chez la souris permettait une sortie d'aplasie plus précoce après irradiation.

Notre étude a pour but de démontrer l'effet de la sérotonine sur les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques.

En nous basant sur des études in vivo, ex vivo et in vitro, nous souhaitons i) identifier le ou les types cellulaires sensibles à la sérotonine, ii) déterminer l'action de la sérotonine sur ces CSH ou progéniteurs hématopoïétiques, et iii) définir le rôle intrinsèque ou extrinsèque de la sérotonine.

Si notre hypothèse est juste, la sérotonine agirait comme un facteur de croissance sur les CSH ou progéniteurs hématopoïétiques, au repos et/ou en situation d'hématopoïèse de « stress ».

Ce projet constitue une étape pré-clinique réalisable au sein de notre laboratoire, indispensable avant d'envisager une application chez l'homme.

Ce travail pourrait avoir un impact majeur puisqu'un traitement par IRS, directement applicable chez l'homme, pourrait réduire la durée de l'aplasie post-chimiothérapie en particulier dans l'autogreffe de CSH, limitant les complications liées à l'aplasie ainsi que les durées d'hospitalisation.

Résultats

COMBINED USE OF SELECTIVE SEROTONIN REUPTAKE INHIBITORS AND HEMATOPOIETIC GROWTH FACTORS

Poster



Serotonin targeting using common antidepressants induces rapid recovery of cytopenia

Tereza Coman, Guillemette Fouquet, Julien Rossignol, Olivier Hermine and Francine Côté



Introduction

Following acute stresses like chemotherapy or radiation, the hematopoietic system quickly adapts by a process termed “emergency” or “stress” hematopoiesis.

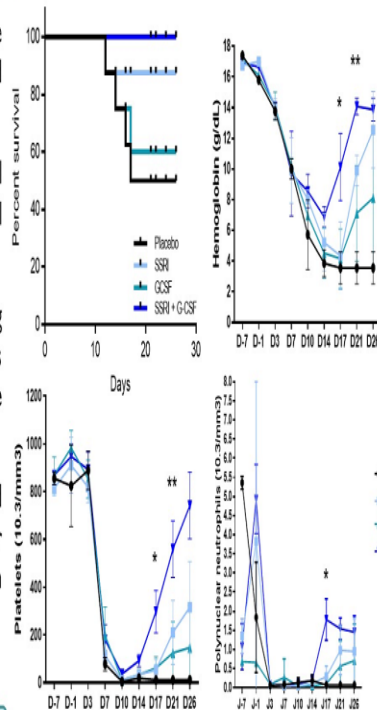
In erythroid progenitors, we recently identified a functional cell-autonomous **serotonergic network** with pro-survival and proliferative functions (Cell Reports 2019).

Pharmacologic restoration of serotonin levels using selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such as fluoxetine, a common antidepressant, can **rescue the anemic phenotype** in mice models.

Here, we hypothesized that the serotonergic system could be a valuable therapeutic target in radiation or chemotherapy-induced **cytopenia**, alone and in cooperation with known hematopoietic growth factors.

Serotonin

Results

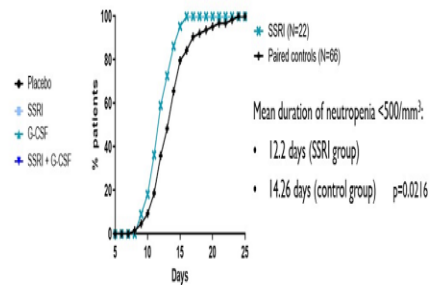


Human cohort

Using a retrospective cohort of adult patients who underwent autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) in the hematology department of Necker hospital, we compared **22 patients treated with SSRI** to **66 matched controls**.

Patients treated with SSRI had a **more rapid neutrophil recovery than matched control patients:**

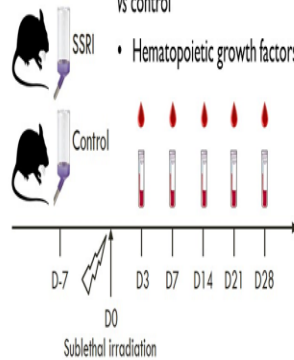
Delay before neutrophils > 500/mm³ after autologous hematopoietic stem transplantation



Mice models

CS7BL/6 control mice (8-10 weeks old) were submitted to sub-lethal irradiation. Hematopoietic recovery was monitored (CBC) comparing:

- SSRI (Fluoxetine 20 mg/kg/d in water) vs control
- Hematopoietic growth factors vs control



First, following sub-lethal irradiation, compared to placebo, fluoxetine fastened **normalization of the erythroid lineage** and the **leukocytes and platelets levels**.

Second, we observed an **additive effect** between fluoxetine and Granulocyte-Colony Stimulating Factor (**G-CSF**) on the recovery of the **three myeloid lineages and on overall survival**.

Day 17 post-irradiation:	Fluoxetine + G-CSF	Control	p
Mean hemoglobin level	10.5 g/dL	4.0 g/dL	<0.0001
Mean leukocyte level	2900 /mm ³	900 /mm ³	<0.0001
Mean platelet level	308 /mm ³	84 /mm ³	0.0009

Finally, under **steady state** condition without any hematopoietic stress, fluoxetine **did not impact** hematopoiesis.

Conclusion

- We report a previously unknown **role of SSRI** in the **hematopoietic recovery of cytopenia**, following ASCT in human and sub-lethal irradiation in mice.
- We observed a **significant cooperation** between **SSRI** and **G-CSF** on the three myeloid lineages.
- We propose that the serotonergic system could be a valuable **therapeutic target** in **stress hematopoiesis** such as in therapy-induced aplasia in patients.

Année: 2018

Bases immunogénétiques et phénotypiques d'identification des cellules NK impliquées dans l'effet antileucémique

RETIERE Christelle - Laboratoire de recherche EFS-PL

CRCINA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie, Nantes-Angers), équipe 1, INSERM U1232 CNRS EFS CHU

Université Nantes/Angers

[Retour tableau](#)

Résumé

Depuis 5 ans, les greffes haploidentiques de cellules souches hématopoïétiques se sont substituées aux greffes de sang de cordon pour répondre à différentes leucémies aiguës chez l'adulte. Ces greffes ont un plus faible coût et sont pratiquées avec succès à partir d'un greffon non manipulé mais en administrant un traitement immunosuppresseur post-greffe, à base de cyclophosphamide, appelé

Baltimore. Pour 30 à 40% des patients pour lesquels une greffe à partir d'un donneur HLA compatible n'est pas possible, la greffe haploidentique offre au contraire un choix large de donneurs familiaux

(parents, fratrie, descendance, voire parents éloignés). Si les réactions du greffon contre l'hôte (GvH) restent de grade limité, les rechutes constituent un problème majeur des greffes haploidentiques Baltimore. Ces greffes présentent de nombreuses incompatibilités HLA propices aux alloréactivités NK dont le rôle anti-leucémique est important. Les gènes KIR et HLA participent à la formation structurelle et fonctionnelle du répertoire NK. Au cours de l'histoire immunologique de chaque individu, ce répertoire est modifié, notamment par le cytomégalovirus, qui favorise l'expansion de cellules NK éduquées. De plus, l'expression d'un large éventail de récepteurs NK augmente sa diversité phénotypique et fonctionnelle. Ainsi, une grande disparité interindividuelle existe au niveau de la structure et la fonction du répertoire NK et donc de son potentiel anti-leucémique. Ce projet a pour objectif de définir sur des bases immunogénétiques et phénotypiques les populations NK ayant un fort potentiel anti-leucémique, et ce au regard de la nature de la leucémie. Ces travaux doivent ainsi aider à la sélection des donneurs de CSH sur des bases immunogénétiques et définir les sous-populations NK exploitables en immunothérapie anti-cancéreuse.

Résultats

David, Gaëlle, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Zakia Djaoud, Pierre Mérieau, Alexandre Walencik, Thierry Guillaume, Katia Gagne, Patrice Chevallier, et Christelle Retière. 2021. « Deciphering the Biology of KIR2DL3+ T Lymphocytes That Are Associated to Relapse in Haploidentical HSCT ». *Scientific Reports* 11 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95245-7>.

Dubreuil, Léa, Patrice Chevallier, Christelle Retière, et Katia Gagne. 2021. « Relevance of Polymorphic KIR and HLA Class I Genes in NK-Cell-Based Immunotherapies for Adult Leukemic Patients ». *Cancers* 13 (15): 3767. <https://doi.org/10.3390/cancers13153767>.

Dubreuil, Léa, Bercein Maniangou, Patrice Chevallier, Agnès Quéméner, Nolwenn Legrand, Marie C. Béné, Catherine Willem, et al. 2020. « Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Cancers* 12 (12): 3595. <https://doi.org/10.3390/cancers12123595>.

Makanga, Dhon Roméo, Francesca Da Rin de Lorenzo, Gaëlle David, Catherine Willem, Léa Dubreuil, Nolwenn Legrand, Thierry Guillaume, et al. 2020. « Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK

Cell Responses against Acute Leukemia ». *Cancers* 12 (7): 1927.
<https://doi.org/10.3390/cancers12071927>.

Makanga, Dhon Roméo, Thierry Guillaume, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Anne Cesbron, Ketevan Gendzekhadze, et al. 2020. « Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution ». *The Journal of Immunology* 205 (5): 1441-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000578>.

Makanga, Dhon Roméo, Maxime Jullien, Gaëlle David, Nolwenn Legrand, Catherine Willem, Léa Dubreuil, Alexandre Walencik, et al. 2021. « Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell response ». *Oncolimmunology* 10 (1): 1936392.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1936392>.

Willem, Catherine, Dhon Roméo Makanga, Thierry Guillaume, Bercein Maniangou, Nolwenn Legrand, Katia Gagne, Pierre Peterlin, et al. 2019. « Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide ». *The Journal of Immunology* 202 (7): 2141-52.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801489>.

Genetic and molecular basis of the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire: implication in the context of acute leukemia

D.R. Makanga^{1,2,5}, F. Da Rin de Lorenzo^{1,2,5}, G. David^{1,2,5}, C. Willem^{1,2,5}, L. Dubreuil^{1,2,5}, N. Legrand^{1,2,5}, T. Guillaume^{1,3}, P. Peterlin³, M.C. Béné^{2,4,5}, A. Garnier³, P. Chevallier^{2,3,5}, A. Cesbron³, K. Gagne^{1,2,5}, B. Clemenceau^{2,5}, C. Retière^{1,2,5}.

¹Etablissement Français du Sang, Nantes, France ; ²CIRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France ; ³Hematology Clinic, CHU, Nantes, France ; ⁴Hematology Biology, CHU, Nantes, France ; ⁵LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, F-44000, France ; *Co-senior authors

INTRODUCTION

Natural Killer (NK) cells are key cytotoxic effectors against leukemia. Killer cell Ig like receptor (KIR) and HLA class I genes participate to the structural and functional formation of NK cell repertoire. Cytomegalovirus (CMV) modifies this repertoire favoring educated NK cell expansion. Moreover, the expression of numerous NK cell receptors increases the phenotypic and functional diversity of NK cell repertoire. Thus, a broad inter individual diversity exists in the structure and function of NK cell repertoire. In this study, we deeply investigated the anti-leukemic potential of NK cells against a panel of acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL) cell lines taking into account the KIR and HLA genetic parameters, NK cell development stages and CMV status of healthy blood donors (n=68).

RESULTS

Experimental approach. (A) PBMC were isolated from blood samples of a cohort of healthy blood donors (n=68) and used to assign KIR genotypes (AA, B*), HLA-C environment (C1C1, C1C2, C2C2) and CMV status. (B) High-resolution NK cell phenotypes were determined by 8 colors flow cytometry on the basis of differentiating markers (CD57, KIR2DL3, NKG2A and NKG2C). (C) The anti-leukemic potential of NK cells was investigated against a panel of acute myeloid (AML) and lymphoid (ALL) cell lines.

A

Cohort of healthy blood donors (n=68)

AA	B*	C1C1	C1C2	C2C2	CMV+	CMV-
7	6	6	6	4	1	5

B

NK cell phenotyping

C

NK cell function (CD37a, CD57)

HLA and KIR genetics and CMV status impact the structure of NK cell repertoire

A

B

C

(A) Heatmap illustrating NK cell repertoire of blood donors from their NK cell subset frequencies using Genesis* software. (B) Charts representing NK cell frequency of 9 investigated NK subsets for 9 clusters of blood donors determined by Genesis*. (C) Schematic representation of how HLA, KIR and CMV status impact the frequency of each NK cell subsets.

NKGA* NK cells are more efficient against the acute lymphoid H9 cell line

A

CD107a+ NK cell%

2DS1-CMV+ others

Individuals

B

NK cell subsets

CD107a+ NK cell%

NK cell degranulation tests from 68 donors was assessed against the H9 cell line taking into account the KIR and HLA genetic parameters and CMV status. (A) KIR2DS1-CMV+ individuals were the best responders against H9. (B) The most effective NK cell subsets against ALL targets express NKG2A.

CD57* NK cells are more efficient against the acute myeloid KG1 cell line

A

CD107a+ NK cell%

C1C2 AA C1C2 B+

Individuals

B

NK cell subsets

CD107a+ NK cell %

NK cell degranulation was assessed against the KG1 cell line taking into account the KIR and HLA genetic parameters and CMV status. (A) C1C2 AA KIR genotyped individuals were the best responders against KG1. (B) The most effective NK cell subsets against AML targets express CD57.

CONCLUSION

In this study, we showed that NK cell immunogenetic impacts the structuration of NK cell repertoire and guides significantly anti-leukemic NK cell responses. We are investigating the anti-leukemic potential of NK cell against primary leukemic cells to validate our data. Overall, our data may support clinical implications as they can optimize the selection of Hematopoietic Stem Cell (HSC) donors on immunogenetic bases and identify the best NK cell subsets in immunotherapy in accordance to the leukemia nature.

ACKNOWLEDGEMENTS. We thank all blood donors who accepted to participate in this study. This work was financially supported by the EFS-CPDL and by grants from IRGHET, Agence de la Biomédecine and la Ligue contre le cancer. DRM is PhD student supported by CIFRE grants (2017/0850)

Année: 2018

Stockage cryogénique des greffons de cellules souches hématopoïétiques et maîtrise du risque

ROUARD Helene - U955 – Institut Mondor de Recherche en Biologie -équipe 10 Biologie du système neuromusculaire

[Retour tableau](#)

Résumé

Les greffons de cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont indispensables dans le cadre du traitement de patients atteints de pathologies malignes hématologiques et oncologiques. Ils permettent une sortie d'aplasie plus rapide et limitent la toxicité de la chimiothérapie de conditionnement. Ces greffons sont conservés congelés en azote vapeur jusqu'à leur reinjection au sein des unités de thérapie cellulaire (UTC). Cependant, des défaillances humaines et/ou techniques peuvent toutefois survenir et aboutir à une perte irréversible de cuves entières de stockage de nombreux greffons.

Bien que l'activité de préparation, conservation, et distribution des produits de thérapie cellulaire soit très réglementée et régulièrement inspectée par l'agence réglementaire compétente ANSM, il a été rapporté ces deux dernières années des incidents graves lors du stockage des greffons de cellules souches hématopoïétiques à visée d'autogreffe avec perte de greffons. Actuellement, il n'existe pas de critères seuils permettant de conserver ou invalider des greffons cryopréservés ayant subi accidentellement une remontée en température ainsi que de données disponibles sur le sujet dans la littérature. C'est pourquoi, La Société Française de Bioingénierie Cellulaire et Tissulaire (SFBCT) souhaite réaliser une étude prospective visant à mimer un réchauffement accidentel afin d'évaluer quantitativement et qualitativement l'impact réel du réchauffement sur les greffons décongelés.

Cette étude prospective visera à reproduire artificiellement une remontée accidentelle de température dans une cuve de stockage. Des greffons constitués au minimum de trois poches seront sélectionnés sur quatre UTC volontaires pour cette étude (CHRU Nancy, CHRU Nice, CHU Saint-Louis Paris, EFS IdF Créteil). Une poche servira de témoin cryoconservé à $T^{\circ} < -140^{\circ}\text{C}$, les deuxième et troisième poches seront réchauffées progressivement dans un dry-shipper jusqu'aux températures cibles ($T^{\circ} = -80^{\circ}\text{C}$ ou $T^{\circ} = -30^{\circ}\text{C}$) puis recongelées immédiatement en azote gazeux. A distance (plus de 48 heures après l'épisode de réchauffement/refroidissement, les greffons seront décongelés de manière standard et les CSH seront analysées quantitativement et qualitativement. L'objectif principal sera de comparer le rendement de récupération des cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs (CD34+) décongelés par rapport à une poche témoin à l'issue de 2 protocoles expérimentaux de remontée en température. L'objectif secondaire sera de comparer le degré de fonctionnalité des cellules CD34+ via un test de clonogénicité.

Cette étude nous permettra de définir des critères seuils de réchauffement au-delà desquels les poches seront considérées comme inutilisables.

[Retour tableau](#)

Année: 2019

Reconstitution de l'immunité humorale après transplantation de moelle osseuse

CANQUE Bruno - Lymphoid development & diseases, Institut Universitaire d'Hématologie, Centre Hayem, Hôpital Saint Louis 1, avenue Claude Vellefaux Paris

[Retour tableau](#)

Résumé

Notre objectif est de réaliser une caractérisation phénotypique, moléculaire et fonctionnelle complète de l'hématopoïèse des patients après transplantation de moelle osseuse en vue d'identifier les mécanismes responsables des perturbations de la différenciation et de la fonction des lymphocytes B, ainsi que du déficit prolongé de l'immunité humorale observé chez ces patients. Ce projet repose sur une publication récente des deux partenaires établissant une nouvelle cartographie de l'hématopoïèse humaine fondée sur une organisation bipartite du compartiment lymphoïde (Alhaj Hussen et al., Immunity, 2017). Le programme proposé s'articule autour de 3 axes principaux : (1) le suivi longitudinal d'une cohorte de patients transplantés, avec ou sans réaction du greffon contre l'hôte, fondé sur un profilage immunophénotypique à large spectre par cytométrie de masse des progéniteurs hématopoïétiques médullaires et sanguins durant les 3 premiers mois après la greffe ; (2) l'étude comparative à l'échelon clonal par "single-cell RNAseq" du profil transcriptionnel des progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques médullaires, ainsi que des populations immunes effectrices présentes au sein la moelle osseuse des patients transplantés; (3) l'analyse du potentiel de différenciation lympho-myéloïde des progéniteurs hématopoïétiques des patients transplantés à l'aide d'un nouveau test fonctionnel de diversification ex vivo. Ce projet permettra de mieux définir les mécanismes des perturbations de l'hématopoïèse chez les patients transplantés et de proposer de nouvelles stratégies en vue d'optimiser la lymphopoïèse B et d'améliorer la reconstitution de l'immunité humorale.

[Retour tableau](#)

Année: 2019

Etude des rétrovirus endogènes humains après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques: expression et impact immunitaire

DEPIL Stéphane - Equipe C. Caux

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)

INSERM U 1052 CNRS 5286

Plateforme d'innovation en Immunothérapie & Immunomonitoring (P3I)

Lyon

[Retour tableau](#)

Résumé

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ACSH) reste à ce jour la seule thérapie cellulaire à visée curatrice pour de nombreuses hémopathies. Malgré de nombreuses avancées, les rechutes restent la première cause de mortalité après greffe. Il est ainsi urgent de mettre au jour de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de renforcer l'effet thérapeutique de l'ACSH sans augmenter la toxicité de la procédure.

Les rétrovirus endogènes humains (HERVs) représentent 8 % du génome humain. Réprimés à l'état basal (principalement par méthylation), ces séquences se réactivent dans différentes situations telles que les maladies auto-immunes et les cancers, pouvant alors engager une réponse immunitaire innée et adaptative. Beaucoup de questions restent actuellement en suspens en particulier dans les hémopathies myéloïdes où très peu de données sont disponibles et le rôle exact des HERVs reste à établir.

Notre équipe travaille actuellement sur le rôle des HERVs dans différents types de cancers. Nous avons développé une approche bioinformatique permettant d'identifier à partir d'une base de données RNAseq les HERVs surexprimés. Nous avons également développé des tests in vitro permettant de vérifier l'immunogénicité de peptides issus des cadres ouverts de lecture de ces séquences, et montré que certains peptides partagés par différentes familles de HERVs peuvent induire une réponse lymphocytaire T CD8+ spécifique. Nous avons récemment analysé 151 échantillons RNAseq de leucémie aiguë myéloïde (LAM) issus des données publiques du TCGA et identifié les HERVs les plus communément exprimés dans cette pathologie. Des tests d'immunogénicité sont actuellement en cours avec du sang périphérique de patient présentant une LAM au diagnostic.

L'objectif principal de cette partie du projet est d'analyser la mise en place de la réponse T CD8+ spécifique dirigée contre les HERVs et participant à l'effet du greffon contre la leucémie après ACSH pour LAM. Les objectifs secondaires sont d'analyser les relations entre cette réponse et différents paramètres cliniques (rechute, GVHD) afin d'identifier les HERVs les plus pertinents dans le cadre de l'ACSH pour LAM.

Les cellules sanguines mononuclées (PBMCs) de patients suivis pour LAM seront prélevés et congelés à différents temps : diagnostic, rémission complète (pré-greffe) et post-ACSH (M3, M6, M12). Ce protocole de recueil prospectif est actuellement déjà en place au centre Hospitalier Universitaire Lyon Sud, une trentaine d'échantillons congelés étant pour l'instant disponibles.

Après sélection des HERVs les plus pertinents par méthode bioinformatique (par niveau d'expression et immunogénicité), des dextramères identifiés par code barre ADN seront synthétisés. Ces dextramères permettant d'identifier les réponses T dirigées contre un maximum de 1000 épitopes, nous pourrons surveiller l'apparition d'une réponse T spécifique dirigée contre les HERVs exprimés dans la LAM pour les HLA les plus communs. Le marquage dextramère sera réalisé sur cellules sanguines mononuclées (PBMCs) après décongélation. Toutes les cellules marquées par les dextramères seront triées. Une

expansion des séquences ADN par PCR sera ensuite réalisée, avant de procéder au séquençage du code barre ADN permettant une restitution des séquences ciblées.

L'étude des réponses T CD8+ dirigées contre les HERVs après ACSH nous permettra de mieux définir le rôle de ces séquences dans la mise en place de l'effet du greffon contre la leucémie. L'identification d'une réponse non corrélée à une majoration de la GvHD nous permettra d'évaluer la pertinence des HERVs en tant que marqueurs tumoraux spécifiques. Une telle découverte ouvrirait le champ à de nombreuses approches d'immunothérapies plus ciblées.

Résultats

Alcazer, Vincent, Paola Bonaventura, et Stephane Depil. 2020. « Human Endogenous Retroviruses (HERVs): Shaping the Innate Immune Response in Cancers ». *Cancers* 12 (3): 610. <https://doi.org/10.3390/cancers12030610>.

Alcazer, Vincent, Paola Bonaventura, Laurie Tonon, Emilie Michel, Virginie Mutez, Clémentine Fabres, Nicolas Chuvin, et al. 2022. « HERVs characterize normal and leukemia stem cells and represent a source of shared epitopes for cancer immunotherapy ». *American Journal of Hematology* 97 (9): 1200-1214. <https://doi.org/10.1002/ajh.26647>.

DEPIL, Stéphane. s. d. Transcriptomic signature based on HERVs expression to characterize leukemic stem cells and useful as an LSC marker. EP 21306648.3.

DEPIL Stéphane. s. d. Use of a transcriptomic signature based on HERVs expression to characterize new acute myeloid leukemia subtypes. EP21306649.1.

[Retour tableau](#)

Année: 2019

Ingénierie de cellules T régulatrices par récepteur chimérique spécifique du donneur en transplantation allogénique

ZUBER Julien - INSERM UMR_S 1163, Institut Hospitalo-Universitaire IMAGINE -24 B du Montparnasse Paris

[Retour tableau](#)

Résumé

Introduction : Une tolérance opérationnelle a été obtenue par transplantation combinée rénale et médullaire au prix d'un régime cytotoxique lourd et d'un risque de maladie du greffon contre l'hôte. Ce constat souligne le besoin de protocoles tolérogènes plus efficaces et moins iatrogènes. A cet égard, la thérapie cellulaire régulatrice spécifique du donneur est très prometteuse. Néanmoins, cette approche est confrontée à la difficulté du très faible nombre de cellules T régulatrices (Treg) allospécifiques. Les récepteurs récepteurs chimériques d'antigènes (CAR) sont composés d'un segment extracellulaire (ScFv), dérivé de la région spécifique d'antigène d'un anticorps, joint à des domaines intracellulaires de signalisation (CD3 et CD28 ou 41BB). Les CAR anti-CD19 ont révolutionné le traitement de certaines hémopathies CD19+ en redirigeant la réponse effectrice anti-tumorale.

Résultats préliminaires et Objectifs : Nous proposons d'orienter la spécificité des Tregs humains par l'expression transgénique de CAR dirigé contre le HLA du donneur (CAR-Tregs). Nous avons conçu deux CAR spécifiques de HLA A2, incorporant comme domaine de costimulation soit CD28 (A2-28-CAR) soit 41BB (A2-BB-CAR). Ces CARs ont été clonés séparément dans un vecteur lentiviral bicistronique encodant également un gène rapporteur (EGFRt). Nous avons obtenu une expansion (100-500 fois) de CAR-Tregs in vitro et montré le maintien de l'expression de FOXP3 et d'HELIOS, garants de l'identité régulatrice. Les CAR-Tregs lient HLA A2 et exercent in vitro une suppression spécifique d'antigène. Conformément à l'hypothèse initiale, nous avons montré que le A2-BB-CAR était supérieur au A2-28-CAR pour l'expansion de CAR-Tregs et l'expression de FOXP3. Nous souhaitons désormais confirmer et valider ces résultats in vivo.

Méthodes : Le modèle de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD xénogénique proposé dans ce projet repose sur le transfert de cellules humaines du sang périphérique (PBMCs) soit HLA A2+ soit HLA A2- chez des souris très immunodéprimées NSG irradiées. Les CAR-Tregs seront transférés dans le même temps que les PBMCs ou de manière différée.

Résultats attendus : Ce projet devrait rapporter des éléments d'efficacité et de tolérabilité, essentiels à la constitution d'un dossier de développement clinique et à l'établissement d'un partenariat industriel :

1. Le co-transfert de CAR-Tregs doit montrer la fonction suppressive spécifique d'antigène in vivo, en protégeant contre la GVHD induite par le PBMC HLA A2+ mais pas HLA A2-

2. Le transfert différé de CAR-Tregs chez une souris avec une GVHD active doit montrer la stabilité des CAR-Tregs en milieu inflammatoire, un aspect essentiel de sécurité

3. La comparaison des deux CAR doit confirmer in vivo la supériorité du A2-BB-CAR sur le A2-28-CAR

Cette étude s'inscrit donc dans un projet plus vaste, visant le développement clinique d'une thérapie cellulaire régulatrice efficace, sûre et individualisée en transplantation.

Résultats

Lamarthée, Baptiste, Armance Marchal, Soëli Charbonnier, Tifanie Blein, Juliette Leon, Emmanuel Martin, Lucas Rabaux, et al. 2021. « Transient mTOR inhibition rescues 4-1BB CAR-Tregs from tonic signal-induced dysfunction ». *Nature Communications* 12 (novembre): 6446. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26844-1>.

Wu, Yongxia, Julien Zuber, et Jianing Fu. 2022. « Editorial: Immunogenomics of Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Frontiers in Immunology* 13 (mars). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.878314>.

[Retour tableau](#)

Année: 2020

Comparaison à long-terme de l'évolution de la vasculopathie cérébrale après greffe vs traitement standard chez les enfants drépanocytaires

BERNAUDIN Françoise - Centre de Recherche Clinique Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil

[Retour tableau](#)

Résumé

Objectifs

La présente étude observationnelle a pour but de réévaluer à distance la cohorte des 67 patients drépanocytaires avec vasculopathie cérébrale détectée par Doppler transcrânien et inclus dans le protocole national « Drépagreffe » et dont les résultats à 1 et 3 ans ont été publiés cette année dans JAMA. Il s'agissait de la première étude prospective mondiale comparant la greffe au traitement standard dans la drépanocytose. L'inclusion dans le bras greffe ou standard était défini par l'existence ou non d'un donneur HLA-identique dans la fratrie. La greffe comparée au traitement standard a très significativement ($p < 0.001$) réduit les vitesses artérielles cérébrales et les a normalisées (< 170 cm/s) chez une plus grande proportion de patients ($p < 0.001$) et a apporté une meilleure qualité de vie. Les résultats ont également été meilleurs en post-greffe en ce qui concerne les lésions ischémiques et les sténoses mais de façon non significative et il n'a pas été retrouvé de différence significative dans les performances cognitives. L'étude biologique à 1 an a montré que la probabilité de normalisation du Doppler était associée de façon indépendante à des taux bas d'Ang-2 et de BDNF.

L'objectif est donc de réévaluer cette cohorte à 9-10 ans de l'inclusion grâce à un financement permettant de réaliser de nouveau les tests cognitifs et les facteurs d'hypoxie non inclus dans le suivi systématique de cohorte. Résultats attendus Nous attendons une confirmation à distance des différences significatives déjà observées entre les 2 groupes à 3 ans et l'apparition d'une différence significative concernant l'évolution des sténoses, lésions ischémiques et performances cognitives. Par ailleurs l'étude biologique des facteurs d'hypoxie n'ayant été prévue et financée qu'à l'inclusion et 1 an et il sera très intéressant de la refaire à distance

Méthodologie

Les investigateurs des centres de suivi de ces patients se sont montrés intéressés et ont déjà donné un accord de principe. Le Centre de Recherche Clinique du CHIC assurera la promotion et présentera le projet à un CPP.

Les fiches d'information sur le projet seront présentées par les investigateurs aux enfants et leurs parents et leur consentement écrit pour la participation sera recueilli.

Les patients lors du bilan prévu dans leur suivi habituel auront un Doppler transcrânien, une IRM/ARM cérébrale et un bilan sanguin complet. Un échantillon de sang sera envoyé à l'EFS de Créteil pour le contrôle de l'immunisation anti-érythrocytaire, l'étude de la phosphatidyl-sérine et plasma et ADN y seront stockés puis envoyés à la fin de l'étude au laboratoire ISTCT (CNRS) à Caen pour les analyses biologiques concernant l'angiogénèse, les facteurs d'hypoxie et une étude approfondie du stress nitroso-redox.

Les tests cognitifs (WPPSI-3 ou WISC-4 ou WAIS-3 selon les âges) seront effectués par une neuropsychologue qui sera recrutée sur des vacances.

[Retour tableau](#)

Année: 2021

Thérapie cellulaire basée sur des Treg déficients pour le gène lymphotoxine α pour prévenir de GVHD

IRLA Magali - Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML)

Campus de Luminy case, Marseille

[Retour tableau](#)

Résumé

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est la complication majeure en clinique dans la greffe allogénique de moelle osseuse qui est responsable d'une morbidité et mortalité importante. Le développement de nouveaux traitements plus spécifiques avec moins d'effets secondaires permettant d'obtenir une tolérance est un objectif majeur dans le cadre de ces greffes. L'utilisation de Treg CD4+Foxp3+ dans les essais cliniques a montré de très bons profils de sécurité et constitue une approche très prometteuse en thérapie cellulaire et en particulier en contexte de GVHD. Néanmoins, cette thérapie basée sur des Treg CD4+Foxp3+ nécessite un grand nombre de cellules à infuser aux patients, ce qui complique son utilisation en routine. Les données préliminaires de mon équipe indiquent que l'axe lymphotoxine constitue un nouveau checkpoint de l'activité suppressive des Treg. De plus, nous avons observé que les Treg déficients en lymphotoxine α sont au moins quatre fois plus immunosuppresseurs *in vivo*, ce qui permet de réduire la quantité nécessaire à injecter. Enfin, nos données indiquent que l'expression de la lymphotoxine α est conservée dans les Treg de phénotype CD4+CD25+CD127^{lo} chez l'homme, ouvrant de nouvelles pistes visant à faciliter leur utilisation en thérapie cellulaire.

L'objectif de ce projet est d'apporter la preuve de concept que l'axe lymphotoxine est un nouveau checkpoint de l'activité suppressive des Treg chez l'homme et que le ciblage de ce gène dans les Treg humains constitue une thérapie innovante pour protéger de GVHD.

En particulier, nous :

- Déterminerons les mécanismes d'action de l'axe lymphotoxine sur l'activité suppressive des Treg humains à l'aide de tests *in vitro* basés sur des cocultures avec des cellules dendritiques humaines.
- Analyserons l'impact de l'inactivation du gène lymphotoxine α par CRISPR-Cas9 dans les Treg humains sur leur signature et leur capacité suppressive à l'aide de tests d'immunosuppression.

-

Apporterons la preuve de concept *in vivo* que l'inactivation du gène lymphotoxine α par CRISPR-Cas9 dans des Treg humains protège de l'apparition de GVHD chez la souris humanisée.

Ce projet novateur permettra de démontrer que l'axe lymphotoxine est un nouveau checkpoint immunitaire permettant de faciliter l'utilisation de la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de Treg afin de prévenir de GVHD. Les connaissances acquises au cours de cette étude aideront ainsi à mettre en place une thérapie cellulaire humaine optimale.

[Retour tableau](#)

Année: 2021

Etat de santé à long terme après greffe de cellules souches hématopoïétiques dans l'enfance pour hémopathie maligne hors leucémie aiguë (SEGOLEN)

SAULTIER Paul - Hôpital La Timone, Service Hématologie Immunologie Oncologie Pédiatrique, Marseille

[Retour tableau](#)

Résumé

Les conséquences à long terme de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez les enfants atteints de leucémies aiguës sont nombreuses et relativement bien documentées. En revanche, les données sur l'état de santé à long terme après greffe de CSH pour les autres hémopathies malignes de l'enfant sont beaucoup plus limitées.

L'objectif principal de cette étude observationnelle multicentrique transversale est de décrire l'état de santé à long terme de patients ayant été traités par une greffe de CSH dans l'enfance pour une hémopathie maligne hors leucémie aiguë (lymphome hodgkinien et non hodgkinien, leucémie myéloïde chronique, leucémie myélomonocytaire chronique).

Ce projet permettra d'explorer les déterminants (médicaux, sociodémographiques, économiques) du devenir (état de santé et qualité de vie) à long terme de ces patients. Sur le plan du soin, il permettra de débiter la structuration à l'échelle nationale du suivi à long terme chez ces patients. Pour réaliser ce projet, notre équipe s'appuiera sur le dispositif français multicentrique LEA de suivi à long terme des leucémies de l'enfance.

Les données seront obtenues au décours de consultations médicales dédiées, réalisées par les investigateurs des centres de cancérologie pédiatrique français participant à l'étude. Les données sociodémographiques et socioéconomiques, cliniques et thérapeutiques, ainsi qu'un grand nombre de données de complications seront recueillis prospectivement : croissance staturo-pondérale, puberté et fertilité, thyroïde, fonction cardiaque, fonction visuelle, tumeurs secondaires, contaminations virales, fonction pulmonaire, métabolisme osseux, métabolisme du fer, syndrome métabolique, autres séquelles (diabète, ostéonécrose, insuffisance rénale chronique, alopecie, atteinte du système nerveux central), ainsi que la qualité de vie.

Ce projet permettra, d'une part, d'apporter de nouvelles connaissances sur l'état de santé à long terme de patients ayant été traités par une greffe de CSH dans l'enfance pour une hémopathie maligne hors leucémie et, d'autre part, de débiter la structuration du suivi à long terme de ces patients. Ce projet permettra donc d'améliorer la prise en charge de cette population fragile en termes de dépistage précoce et de mesures préventives de ces complications à long terme.

[Retour tableau](#)

Année: 2022

Organisation lymphoïde tertiaire au cours de la GVH chronique

FORCADE Edouard - Laboratoire Immunoconcept - UMR CNRS 5164,

Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux

[Retour tableau](#)

Résumé

La GVH chronique (cGVHD pour chronic graft-vs-host-disease) est la principale source de morbi-mortalité après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (alloCSH) avec une incidence de 30 à 60%. Les études translationnelles ont mis en évidence différentes sous-populations lymphocytaires T (LyT) alloréactives associées à la cGVHD, ainsi qu'un défaut de populations régulatrices. Des perturbations homéostatiques lymphocytaires B (LyB), associées une production excessive de BAFF, favorisent également l'émergence de clones auto-réactifs impliqués dans la maladie.

Chez les patients alloCSH, nous avons mis en évidence (Forcade et al, Blood 2016) une population de LyT CD4+ appelés TFH (T follicular helpers), dans le sang, possédant une activité d'aide pour les LyB de façon similaire à la réaction du centre germinatif. Dans la cGVHD, les TFH sont activés, ont un profil Th1/Th17, présentent des capacités d'« aide » augmentées pour les LyB, pouvant ainsi favoriser la production d'auto-/allo-anticorps. Ceci est aussi associé à une augmentation des taux plasmatiques de CXCL13 suggérant une augmentation du « homing » de ces populations vers les tissus lymphoïdes.

Liarski et al (STM 2014) ont rapporté, au sein des tissus cibles de l'inflammation lupique, la présence de TFH présentant un contact étroit avec des LyB, dont le regroupement s'apparente à des structures lymphoïdes tertiaires (SLT).

Nos données préliminaires, portant sur des biopsies de tissus siège de cGVHD, montrent la présence d'un infiltrat LyT CD4+ dont certains expriment des marqueurs classiques des TFH (CXCR5, ICOS, PD1).

Ainsi, nos objectifs sont :

Rechercher des TFH et des LyB par cytométrie en flux dans les tissus cibles de la cGVHD

Comparer le phénotype des TFH et LyB sanguins et ceux présents dans les tissus cibles de la cGVHD

Comparer le profil d'expression génique des TFH et LyB du sang et des tissus cibles chez les patients présentant une cGVHD.

Résultats attendus :

Des TFH et des LyB sont présents au niveau des tissus cibles de la cGVHD et peuvent constituer des structures lymphoïdes tertiaires dans les tissus cibles de la cGVHD ;

Les populations immunitaires des tissus cibles de la cGVHD expriment le CXCL13 favorisant le homing des TFH du sang vers les tissus.

Méthodologie :

Cette étude repose sur une analyse conjointe des populations immunitaires dans le sang et le tissu cible de la cGVHD. La peau étant l'organe le plus fréquemment atteint et le plus facilement accessible, l'analyse

tissulaire reposera sur des biopsies de peau. La réalisation d'une biopsie à visée de recherche fait l'objet d'une demande CPP (dossier en cours).

Cette étude utilisera la cytométrie en flux (CMF) pour :

Caractérisation phénotypique : marqueurs TFH (CD4, CD45RA, CXCR5, PD1, BCL-6), marqueurs de homing et marqueurs d'activation, et marqueurs LyB ;

L'analyse sur tissu sera réalisée après digestion à la collagénase et obtention d'une suspension cellulaire ;

Comparaison du phénotype des populations (TFH, LyB principalement) entre le sang et le tissu cible de la cGVHD (N=20), et comparaison avec le profil observé dans des organes lymphoïdes secondaires provenant d'individus sains (amygdales, CPP déjà obtenu).

Une partie de la biopsie sera conservée en RNAlater pour étude moléculaire (RT-qPCR) des gènes de cytokines.

Dans un deuxième temps, une étude transcriptomique (RNAseq) sera réalisée à partir de 3 nouveaux patients, pour étude comparative des TFH isolés par Facs à partir du sang et du tissu cible de la cGVHD.

2977 caractères / 3000

[Retour tableau](#)

Année: 2022

Reprogrammation des cellules de sang placentaire pour le développement de thérapies cellulaires antitumorales allogéniques

GALAINÉ Jeanne - UMR1098 RIGHT

Etablissement Français du Sang – Bourgogne Franche Comté –

8 rue du Dr JFX Girod – 25 020 Besançon

[Retour tableau](#)

Résumé

La reprogrammation des lymphocytes T (LT) par l'induction de l'expression d'un CAR (Chimeric Antigen Receptor) à leur surface est considérée comme une révolution thérapeutique en oncologie. Aujourd'hui, cette stratégie utilise majoritairement les cellules du patient (approche autologue), ce qui présente de nombreux inconvénients. Ainsi des approches allogéniques se sont développées en utilisant les LT d'un donneur sain. C'est dans cette stratégie que se positionne le sang placentaire (SP). Les unités cryoconservées dans des banques de cellules constituent une véritable source de cellules qualifiées (LT et NK), disponibles à la demande et de façon quasi-illimitée. De plus, le phénotype naïf des LT du SP permet de générer des LT fonctionnels moins différenciés et plus persistants in vivo. L'objectif de ce projet est de développer des stratégies de thérapie cellulaire antitumorale à partir de SP disponible « off the shelf ».

Deux types de productions seront développées : La première en allogénique HLA « matché » entre donneur et receveur. Les USP cryoconservées présentent une diversité HLA importante et l'expérience en greffe de CSH a montré leur moindre allogénicité permettant une compatibilité HLA moins stricte entre donneur et receveur. Pour cet axe, l'expression du TCR endogène sera éteinte. Une seconde approche en allogénique sans HLA sera développée en parallèle permettant d'injecter les CAR-T quel que soit le phénotype HLA du donneur. Dans cet axe, l'expression du TCR, de la beta 2 microglobuline et de la chaîne CD74 seront éteintes.

La preuve de concept de ces deux approches sera réalisée dans un modèle de leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes (LpDC). Les USP non conformes issues de la banque de Besançon seront utilisées pour la génération de CAR-T cell ciblant la molécule CD123 exprimée par les LpDC.

La génération de CAR123 à partir des LT naïfs du SP a déjà été testé à partir de SP frais (moins de 24h) et cryoconservé. Les résultats préliminaires montrent que l'expansion des CAR123 permet de conserver un phénotype peu différencié tout en assurant une fonctionnalité in vitro efficace .

Cette première étape validée, la génération de CAR-T allogénique HLA matché ou sans HLA sera réalisée en utilisant la technologie CRISPR-Cas9. Différents paramètres seront analysés comme le profil de différenciation, la fonctionnalité (cytotoxicité, dégranulation et sécrétion de cytokines) pour valider la fonctionnalité du CAR-T in vitro ainsi qu'un test pour tester l'absence d'alloréactivité des CAR123 TCR et CMH négatifs (MLR).

[Retour tableau](#)

Année: 2022

Métabolisme des cellules souches hématopoïétique au cours de l'autorenouveau

GUITART Amélie - Bat TP - 4^e étage - BP 10
Université de Bordeaux / Site Carreire 146, rue Leo Saignat

[Retour tableau](#)

Résumé

La thérapie par greffe de CSH est principalement indiquée dans le traitement des leucémies aiguës, de certains lymphomes et myélomes mais également des tumeurs solides, pour certaines de ces pathologies elle reste à ce jour la seule option curative. En 2019, en France, 4 979 patients ont reçu une ou plusieurs greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH), au niveau européen ils étaient 40 000 en 2014, et ce nombre est en constante augmentation. La réussite d'une greffe de CSH est directement liée à la quantité et la qualité des cellules du greffon, or ces cellules sont présentes en très petit nombre dans l'organisme. La capacité d'amplifier ces cellules ex vivo est donc un enjeu majeur pour augmenter le taux de réussite de cette thérapie. Depuis la première greffe de moelle osseuse il y a 50 ans, des efforts constants ont été fournis pour maîtriser l'expansion de CSH mais les résultats restent encore insuffisants. Ces dernières années ont vu l'émergence de travaux démontrant que les CSH modifient leur métabolisme pour s'adapter aux exigences imposées par l'organisme (lors du développement, d'un stress ou à l'état basal). Chez l'adulte, les CSH prolifèrent peu alors qu'au cours du développement embryonnaire elles accomplissent une prolifération massive afin de générer toutes les CSH qui seront présentes chez l'adulte. Les CSH fœtales sont donc un excellent modèle pour comprendre les mécanismes régulant l'expansion des CSH.

Ce projet propose d'utiliser la plasticité métabolique des CSH, encore peu exploitée en clinique, pour accroître leur prolifération. Il vise 3 objectifs :

- Comparer le métabolisme des CSH adultes (quiescentes et actives) et fœtales (proliférantes) pour trouver quelles voies sont impliquées dans l'expansion
- Modifier le métabolisme des CSH fœtales afin de valider son rôle régulateur.
- Analyser le métabolisme de CSH adultes dans un contexte d'expansion

Au-delà de la question fondamentale de l'expansion des CSH fœtales, phénomène encore mal compris, ce projet aura des applications en clinique pour améliorer le système d'expansion ex vivo des CSH. En effet, c'est le point limitant pour développer pleinement le potentiel des CSH pour la thérapie cellulaire et génique en médecine régénérative.

[Retour tableau](#)

Année: 2023

Évaluation d'un ciblage d'IFNAR dans le traitement du lichen plan compliquant la greffe de cellule souche hématopoïétique

BOUAZIZ Jean David - INSERM U976 - Hopital saint Louis

[Retour tableau](#)

Résumé

Introduction :

Le lichen plan est une dermatite d'interface caractérisée histologiquement par des nécroses kératinocytaires et une infiltration lymphocytaire au niveau de la jonction dermo-épidermique. Il peut être d'origine auto-immune (LP) ou bien allo-immune, compliquant les transplantations de moelle hématopoïétique en tant que manifestation de réaction du greffon contre l'hôte (IpGVH). Les mécanismes sous tendant les interactions kératinocytes – lymphocytes dans les dermites d'interface sont mal connus. Une étude récente a montré l'implication de la voie de l'interféron gamma (IFN-II) dans la cytotoxicité kératinocytaire médiée par les lymphocytes dans le LP. Le rôle des interférons de type I (IFN-I) a également été suggéré dans le LP depuis plusieurs années. La physiopathologie du IpGVH est quant à elle mal connue et notre équipe a récemment montré une forte activation de la voie des IFN-I dans les IpGVH.

L'objectif de ce travail est de déterminer le rôle des IFN-I dans les LP et IpGVH et d'évaluer le blocage de cette voie comme cible thérapeutique potentielle.

Matériel et méthodes :

Une première partie descriptive étudiera en séquençage ARN sur cellule unique l'expression génique dans la peau de patients atteints de lichen plan (LP et IpGVH) versus contrôles sains. L'expression différentielle des gènes d'intérêts sera confirmée en PCR quantitative et l'expression des protéines d'intérêts sera confirmée en immunohistochimie. La seconde partie fonctionnelle sera basée sur un modèle in vitro de co-culture kératinocytes – lymphocytes. Le modèle allogénique sera mis en place à partir d'une lignée cellulaire kératinocytaire et de lymphocytes circulant de donneurs sains. Le modèle autologue comportera les kératinocytes primaires issus de prélèvements de patients (LP ou IpGVH ou contrôles) et les lymphocytes mis en coculture seront isolés du sang circulant ou directement du derme du même donneur. On étudiera l'effet d'une stimulation directe par les différents sous types d'IFN-I et d'autre part l'effet du blocage de la voie des IFN-I par différents inhibiteurs, à savoir un anticorps anti-récepteur aux IFN-I, un inhibiteur de TYK2 en aval de ce récepteur, et des inhibiteurs de la synthèse de différents sous types d'IFN-I par les kératinocytes. Le critère de jugement sera la cytotoxicité des lymphocytes sur les kératinocytes qui sera quantifié en cytométrie de flux (FACS). Les mécanismes de mort cellulaire apoptose et nécroptose seront qualifiés par western blot et l'expression des signaux de mort cellulaires et des cytokines inflammatoires seront quantifiés en FACS et ELISA.

Résultats espérés :

Cette étude devrait nous permettre de confirmer l'implication de la voie des IFN-I dans les lichens et de préciser son rôle dans les interactions inter-cellulaires entre les différents acteurs dans les atteintes lichénoides cutanées. Ce travail pourrait donner un rationnel à l'utilisation d'un inhibiteur de la voie IFN-I chez les patients atteints de lichen plan.

[Retour tableau](#)

Année: 2023

Impact des polymorphismes des gènes KIR, HLA de classe I classiques et non-classiques sur le devenir des greffes de CSH haplo-identiques (étude multicentrique POLKA)

GAGNE Katia - EFS CPDL - Equipe 12, CRCI2NA - INSERM UMR1307, CNRS UMR 6075 - Nantes

[Retour tableau](#)

Résumé

Dans le contexte des greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) haplo-identiques non T déplétées avec ajout de cyclophosphamide post-transplantation (haplo-PTCy), les cellules Natural Killer (NK) sont les premiers effecteurs cytotoxiques efficaces contre les cellules tumorales ou infectées par un virus. Elles sont capables de détecter l'absence d'expression des molécules HLA de classe I du soi à la surface des cellules leucémiques ou des molécules HLA de classe I allogéniques via les récepteurs KIR (Killer cell Immunoglobulin-like receptor) inhibiteurs. Les molécules HLA de classe I classiques (HLA-A, -B, -C) (HLA-Ia) ainsi que les non -classiques (HLA-E, -F, -G) (HLA-Ib) sont les ligands des KIR. En dehors des interactions KIR/HLA, l'hétérodimère CD94/NKG2A qui a pour ligand la molécule HLA-E, joue aussi un rôle important dans les réponses NK anti-leucémiques. Les gènes KIR/HLA constituent la paire récepteur/ligand la plus polymorphe et polygénique chez l'Homme.

Nous avons montré que la génétique KIR et l'environnement HLA de classe I orientaient la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK expliquant en partie la diversité des réponses NK anti-leucémiques. En greffes haplo-PTCy, nous avons observé un taux de rechute plus faible chez les patients avec des pathologies myéloïdes lorsque le donneur de CSH présente un contenu en gènes KIR particulier. Ces données obtenues sur un effectif limité de greffes haplo-PCTy locales suggèrent l'effet bénéfique de certains produits d'allèles KIR sur les réponses NK.

Nous émettons l'hypothèse que la prise en compte du polymorphisme allélique des gènes KIR et des ligands HLA Ia/Ib pourrait favoriser une réponse NK anti-leucémique efficace et jouer un rôle crucial en post-greffes haplo-PTCy chez des patients atteints de leucémies aiguës.

Dans ce projet, en combinant des approches d'immunogénétique ciblant le polymorphisme des gènes KIR, des gènes HLA-Ia/Ib et d'immunobiologie axées sur les cellules NK, nous proposons :

- 1) dans un contexte physiologique, d'évaluer l'impact des gènes KIR et des ligands HLA-Ia/Ib sur la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK à partir de donneurs de sang,
- 2) dans un contexte allogénique, d'évaluer l'impact des allèles KIR et HLA-Ia/Ib sur le devenir post-greffe à partir d'un effectif multicentrique de greffes haplo-PTCy
- 3) dans un contexte anti-leucémique, de documenter la fréquence des altérations d'expression des molécules HLA-Cw, HLA-E, HLA-F et HLA-G sur des blastes issus de patients leucémiques.

A termes, ces travaux menés conjointement par 2 équipes de recherche EFS doivent permettre de mieux appréhender les règles impliquant les gènes KIR/HLA polymorphes qui gouvernent la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK et de définir des marqueurs KIR/HLA prédictifs d'une bonne réponse NK afin d'améliorer la prise en charge des patients leucémiques et le devenir des patients en post-greffe haplo-PTCy.

Résultats

Legrand, Nolwenn, Perla Salameh, Maxime Jullien, Patrice Chevallier, Enora Ferron, Gaelle David, Marie-Claire Devilder, et al. 2023. « Non-Expressed Donor KIR3DL1 Alleles May Represent a Risk Factor for Relapse after T-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Cancers* 15 (10): 2754. <https://doi.org/10.3390/cancers15102754>.

[Retour tableau](#)

Année: 2023

Evaluation d'impact de NewSpringForMe, première solution digitale d'accompagnement du patient allogreffé (moelle osseuse ou cellules souches hématopoïétiques)

PEFFAULT DE LATOUR Régis - Fonds de dotation HTC Project

Service Hématologie Greffe - Hôpital Saint-Louis

[Retour tableau](#)

Résumé

Contexte :

Depuis quelques années, les recherches dans les domaines de la greffe et de la psycho-neuro-immunologie mettent en exergue l'influence mutuelle des santés psychologique et physique sur les chances de succès de la greffe. En effet, la prise en charge simultanée de l'esprit et du corps permet d'assurer une meilleure préparation à la greffe pour une récupération plus rapide grâce à la limitation de la survenue des complications. A l'heure actuelle, il n'existe pas de programme d'accompagnement global dans le domaine de la greffe de moelle osseuse pouvant aider les patients à surmonter les difficultés de la préparation à la greffe, de la période d'hospitalisation en milieu protégé ainsi que celles liées au retour à la vie sociale et professionnelle. Alliant psychologie, nutrition et activité physique adaptée, la solution digitale NewSpringForMe vient compléter et renforcer les soins dispensés par le corps médical, permettant

ainsi une prise en charge globale du patient greffé tout au long du parcours de greffe, et visant à une meilleure préparation, condition du mieux vivre vers sa rémission.

Objectifs :

Mesurer l'impact de l'utilisation de NewSpringForMe sur les paramètres physiques, psychologiques et nutritionnels du patient allogreffé

Mesurer l'impact de l'utilisation de NewSpringForMe sur la survenue et l'étendue des complications post-greffe et la récupération post-greffe

Evaluer la recevabilité de l'outil digital et de ses outils en termes d'attractivité, de compréhension, d'utilité

Optimiser l'association des contenus en fonction de profils des patients pour chacune des dimensions

Etablir des « super-profils » de patients issus de la combinaison des trois dimensions afin de développer un algorithme faisant appel à l'intelligence artificielle et ainsi optimiser l'association des contenus aux profils des patients

Résultats attendus :

Maintien/amélioration des paramètres psychologiques, nutritionnels et physiques des patients inclus dans un protocole de greffe

Maintien d'un bien-être global à long terme et de la santé mentale

Préparation optimisée au protocole de greffe pour une limitation de la survenue des complications post-greffe et une récupération plus efficiente

Démonstration de la recevabilité et de l'utilité de NewSpringForMe pour une intégration au parcours de soin

Démonstration de l'adéquation entre les besoins exprimés par les patients en termes d'accompagnement et les contenus proposés par la solution digitale

Méthodologie :

NewSpringForMe propose un espace personnalisé et évolutif accessible via une plateforme web, offrant, en permanence, selon les besoins et le rythme du patient, une palette de recommandations, d'outils et d'exercices en psychologie, nutrition/diététique et activité physique adaptée, étroitement complémentaires des traitements médicaux prodigués par les équipes de soins. L'évaluation de l'impact de l'utilisation de la plateforme sur la qualité de vie et l'accompagnement du patient allogreffé se fera via une cohorte monocentrique de 170 patients qui bénéficieront d'un suivi longitudinal allant jusqu'à un an après leur inclusion correspondant à l'annonce de la greffe. Il est prévu un recueil de données générées par l'utilisation de l'outil et des différents espaces pour permettre une évaluation des paramètres nutritionnels, physiques et psychologiques, une évaluation de la survenue et de l'étendue des complications post-greffe, et de la recevabilité et de la pertinence du dispositif digital.

[Retour tableau](#)

Année: 2023

NUTRIREG-T cells : expression contrôlée d'un gène thérapeutique dans les lymphocytes T pour une utilisation en immunothérapie cellulaire

ROUZAIRE Paul - EA(UR) CHELTER 7453 Université Clermont-Auvergne,

[Retour tableau](#)

Résumé

L'immunothérapie cellulaire est actuellement en pleine expansion en oncologie. Il s'agit d'une approche thérapeutique utilisant des cellules du système immunitaire pour remplacer, réparer, augmenter ou modifier l'activité biologique d'un tissu ou d'un organe endommagé. Ce principe est largement utilisé dans le traitement des hémopathies malignes, en particulier avec l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) qui reste à ce jour le seul traitement curatif pour certains types de leucémie aigüe. Cependant, il existe à ce jour de nombreuses difficultés à contrôler le greffon une fois réinjecté au malade, soit pour majorer son action thérapeutique, soit pour limiter sa toxicité, en particulier celle de la GVH (réaction du greffon contre l'hôte, Graft versus Host disease). Il y aurait donc un fort intérêt de développer un système de régulation génique souple et facilement réversible, qui permettrait de contrôler l'activité des cellules T.

Le présent projet concerne l'utilisation d'une nouvelle technologie appelée NUTRIREG, un système qui permet l'induction contrôlée d'un transgène thérapeutique par l'ingestion d'un régime déficient en un acide aminé indispensable en utilisant les propriétés de la voie de signalisation GCN2-ATF4.

Notre objectif est de pouvoir utiliser ce système en intégrant directement la construction génétique inducible dans les lymphocytes T (LT) du donneur de cellules souches hématopoïétiques avant réinjection au patient. L'utilisation d'un régime carencé en un acide aminé indispensable permet alors l'expression du « peptide médicament » à la demande quand il est nécessaire.

Nous avons d'ores-et-déjà démontré qu'il est possible de contrôler l'expression d'un gène rapporteur ou d'un gène à orientation thérapeutique tel que l'IL-10 dans des LT humains *in vitro*, permettant pour ce dernier d'orienter la différenciation du LT vers un phénotype régulateur de type Tr1 (T regulatory 1).

Nous avons également démontré qu'il est possible d'induire l'expression du transgène IL-10 sous la dépendance de NUTRIREG dans des LT humains injectés à des souris immunodéficientes.

Ces premières preuves de concept de la fonctionnalité de la technologie NUTRIREG dans les lymphocytes T humains ouvrent la voie vers de nombreuses stratégies préventives ou curatives dans le domaine de l'immunothérapie cellulaire. Nous souhaitons donc poursuivre ces travaux *in vitro* en optimisant la construction génétique avec le transgène IL-10, mais aussi avec d'autres transgènes pouvant orienter le lymphocyte T vers un phénotype régulateur afin de prévenir ou traiter une réaction du greffon contre l'hôte. Nous souhaitons en parallèle travailler dans des modèles pré-cliniques visant à démontrer que notre système est efficace et dénué d'effet indésirable chez la souris, avant de pouvoir développer notre système dans des essais cliniques chez l'Homme.

[Retour tableau](#)

