

Introduction : L'identification de biomarqueurs représente l'une des étapes les plus précoces et difficiles du développement d'outils diagnostiques et de stratégies thérapeutiques. Malgré les progrès récents réalisés dans le dépistage du virus et la prise en charge des patients, de nombreux aspects de l'infection demeurent incompris. L'objectif de ce projet est de rechercher grâce à une approche protéomique des biomarqueurs signant la résolution de l'infection par le VHC.

Méthodes : La mise en œuvre en transfusion sanguine du dépistage génomique viral permet de détecter des donneurs dans la phase précoce de l'infection VHC. La recherche de biomarqueurs a été basée sur la comparaison de profils protéiques de plasmas de donneurs ayant résolu leur infection avec ceux de porteurs chroniques et de donneurs négatifs. La technologie SELDI (*Ciphergen Biosystem*) utilisée, combinant la capture de protéines directement à partir d'un extrait brut sur des surfaces actives (puces à protéines) avec l'analyse par spectrométrie de masse, a permis de sélectionner deux candidats. Après chromatographie, les fractions purifiées ont été analysées par électrophorèse bidimensionnelle en vue de l'identification des candidats par séquençage.

Perspectives : Les candidats biomarqueurs découverts doivent être évalués en tant qu'outils de dépistage. Leur effet sur le phénotype hépatique et sur l'infection sera étudié *in vitro* dans notre modèle de cultures primaires d'hépatocytes humains.

Conclusion : Le SELDI permet de rechercher des protéines d'intérêt directement dans le plasma humain. Les nouveaux outils hérités de la génomique fonctionnelle présentent un réel potentiel dans le cadre du diagnostic.

SPD1-06

RECHERCHE DE L'ADN DU PARVOVIRUS B19 DANS DES POOLS DE PLASMA DU L.F.B SUR L'AUTOMATE LIGHTCYCLER V2.0 À L'AIDE DE DEUX TROUSSES COMMERCIALES. COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS À L'AFSSAPS ET AU L.F.B.

LAPEYRE M.*, GOUJON N.*, LIEVRE V.*, MOUILLOT L.*, TISSIER M.-H.*, VISSE C.**
*AFSSAPS, ST-DENIS, FRANCE ; **L.F.B., LES ULIS, FRANCE

laurence.mouillot@afssaps.sante.fr

La Pharmacopée Européenne 5^{ème} édition parue en juin 2004 et applicable au 1^{er} janvier 2005 rend obligatoire la recherche de l'ADN du parvovirus B19 dans les pools de plasma destinés à la fabrication de certains médicaments dérivés du sang. Elle fixe le seuil d'exclusion à 10⁴ UI/ml et recommande d'utiliser un réactif capable de détecter les variants du B19.

Une étude en aveugle a été effectuée à l'Afssaps et au LFB sur des échantillons de pools de 300 dons provenant du LFB,

chacun d'entre eux étant constitué de six pools de 50 dons. Une extraction automatique sur MagNA Pure suivie d'une amplification/détection Roche sur LightCycler V1.2 a été mise en œuvre au LFB, une extraction manuelle High Pure Viral suivie de deux amplifications/détections Roche et Artus sur LightCycler V2.0 ont été effectuées à l'Afssaps. Au total 101 pools de 300 dons, le standard international d'ADN du parvovirus B19 dilué à 10⁴ UI/ml et utilisé comme témoin seuil ainsi que la souche du variant A6 de la Pharmacopée Européenne ont été testés.

Résultats : sur les 101 pools de plasma testés, trois ont été détectés supérieurs à 10⁴ UI/ml et confirmés sur les pools de 50 dons. Cette étude nous a en outre permis de comparer la sensibilité et la spécificité des deux trousse vis à vis d'un variant du B19.

SPD1-07

MISE AU POINT LA MÉTHODE D'AMPLIFICATION PMCA (PROTEIN MISFOLDING CYCLIC AMPLIFICATION) POUR LA DÉTECTION DE LA PROTÉINE PRION INFECTIEUSE

LEON F., SEGARRA C., COSTE J.

LABO DE RECH. ET DEV. AGENTS TRANSMISSIBLES PAR TRANSFUSION, EFS PYRÉNÉES-MEDITERRANÉE, MONTPELLIER, FRANCE

joliette.coste@efs.sante.fr

Introduction : Depuis les publications de deux cas probables de transmission de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jacob par transfusion chez des patients britanniques, l'hypothèse de la présence de la protéine prion pathologique (PrPsc) dans le sang ne peut plus être exclue. La méthode PMCA, basée sur l'amplification de la PrPsc, permettrait la mise en évidence dans le sang de faibles concentrations de PrPsc non détectées à ce jour.

Objectif : Développer un test de dépistage de la PrPsc dans les composants cellulaires du sang humain. La première étape consiste à reproduire et à optimiser la technique PMCA décrite initialement sur des cerveaux de hamster, en vue de son adaptation sur le sang de hamster puis sur le sang humain.

Matériel et méthode : La PMCA repose sur des cycles successifs d'incubation et de sonication. Lors de l'incubation, des agrégats de protéines PrPsc sont formés à partir d'une faible quantité de PrPsc initiant la transconformation de la protéine prion normale (PrPc) en PrPsc. La sonication des agrégats entraîne la formation de nombreux noyaux de nucléation permettant de nouvelles amplifications. La PrPsc amplifiée est détectée par Western Blot.

Résultats : La PMCA permet d'amplifier 35 fois la quantité initiale de PrPsc. L'optimisation de cette technique (x120) a pu être obtenue par l'apport de cofacteurs. La méthode est reproductible et spécifique.

Conclusion et perspectives : La PMCA serait adaptée à la détection de la PrPsc dans le sang (seuil estimé à 0,03 pmol). Des essais d'amplification à partir de globules blancs de hamster infecté sont en cours et devraient permettre par la suite d'adapter cette méthode au dépistage dans le sang humain.

Thérapies cellulaires

Modérateurs : L. Sensébé et P. Tiberghien

SPD2-01

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE CULTURE DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES À USAGE CLINIQUE

SENSEBE L.*, BOURIN P.**, RICHARD M.-J.**, ROUARD H.****, BERGER MARC, CHU*****, ELJAAFARI A.*****, FARDEL O.*****, LOPEZ M.*****, DOUAY L.*****,
*EFS CENTRE-ATLANTIQUE, TOURS, FRANCE ET SFGM-TC ; **EFS PYRÉNÉES-MÉDITERRANÉE, TOULOUSE, FRANCE ET SFGM-TC ; ***EFS/CHU, GRENOBLE, FRANCE ET SFGM-TC ; ****EFS ÎLE DE FRANCE, CRÉTEIL, FRANCE ET SFGM-TC ; *****CLERMONT-FERRAND, FRANCE ET SFGM-TC ; *****CHU, NANCY, FRANCE ET SFGM-TC ; *****CHU, RENNES, FRANCE ET SFGM-TC ; *****INSERM U76, PARIS, FRANCE ET SFGM-TC ; *****TROUSSEAU AP-HP, PARIS, FRANCE ET SFGM-TC

luc.sensebe@efs.sante.fr

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes. Leur potentiel d'immunomodulation a conduit la SFGM-TC (Société de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire) à mettre en place un groupe de travail sur la culture de CSM à usage clinique.

Les pré-requis pour la culture des CSM individualisés par le groupe de travail étaient : le milieu de culture, les densités d'ensemencement aux différents temps de culture, la démonstration du caractère CSM des cellules cultivées et la sécurisation du procédé.

Pour simplifier le procédé, le matériel de départ a été les cellules nucléées totales de la moelle osseuse. Après les premiers essais, le milieu de base retenu a été l'aMEM sans nucléotides supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal. Lors de la mise en culture, les meilleurs rendements ont été obtenus avec la densité la plus faible : 50×10^3 cellules/cm² (0,38) vs 100×10^3 cellules/cm² (0,19 – $p < 0,0002$). Après le premier temps (P0), une fois la confluence obtenue, les cellules étaient passées, la encore les meilleurs rendements ont été obtenus avec la plus faible densité : 1×10^3 cellules/cm². L'apport de FGF2 (1 ng/mL) a permis d'augmenter les rendements quelque soit la densité, à P1 à 1×10^3 cellules/cm²

(amplification: $x19$ vs $x51$ avec FGF2) et de raccourcir le temps total de culture d'environ une semaine.

Le protocole permet l'obtention de cellules qui présentent toutes les caractéristiques des CSM : - phénotype : CD90, CD73, CD13, CD49a, CD105, CD146 positives ; CD45 et CD34 négatives, - fort taux de clonogénicité (34 % de CFU-F à J42), - maintien de la multipotentialité avec différenciation dans les voies ostéocytaire, chondrocytaire et adipocytaire.

SPD2-02

L'OS TRABÉCULAIRE : UNE NOUVELLE SOURCE DE CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

COIPEAU P.*, DELORME B.**, ROSSET P.***, LANGONNE A.****, CHARBORD P.**, SENSEBE L.****
*DÉPARTEMENT D'ORTHOPÉDIE-CHU ET INSERM-ESPRI/EA3855, TOURS, FRANCE ET GENOSTEM, EUROPE ; **INSERM-ESPRI/EA3855, TOURS, FRANCE ET GENOSTEM, EUROPE ; ***DÉPARTEMENT D'ORTHOPÉDIE-CHU, TOURS, FRANCE ET GENOSTEM, EUROPE ; ****EFS ET INSERM-ESPRI/EA3855, TOURS, FRANCE

luc.sensebe@efs.sante.fr

Le potentiel ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et leur production à usage clinique amènent à leur utilisation pour la réparation osseuse.

Lors d'intervention pour mise en place de prothèse totale de hanche, nous avons cultivé des CSM à partir de deux sites d'os trabéculaire, trochanter et tête fémorale. Les cellules nucléées totales ont été recueillies soit par aspiration au niveau de la crête iliaque ou du trochanter ($n=6$) ou par lavage des pièces d'os trabéculaire (tête fémorale, $n=14$ et trochanter, $n=8$). Les cellules nucléées totales ont été ensemencées à la concentration de 50×10^3 /cm² en aMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal. Le milieu était changé deux fois par semaine et à J21 les cellules adhérentes étaient recueillies et ensemencées à 1×10^3 /cm². Les cellules ont été cultivées jusqu'à J62. À chaque étape, le nombre de cellules, l'amplification, le phénotype et le nombre de CFU-F ont été mesurés. Pour chaque source, le potentiel de différenciation a été testé. Dès J42 (P1), on ne retrouvait plus de contaminant hématopoïétique et les cellules avaient un phénotype de CSM. Il n'y avait pas de différence entre les CSM obtenues du trochanter ou de la tête fémorale. On trouvait une diminution du taux d'amplification au delà de P1: P1 (tête : 11,6; trochanter 12,9) et P2 (tête : 5,1; trochanter : 2,8). Le taux de CFU-F était toujours identique entre les deux sites. À partir de J42 ces paramètres diminuaient par rapport aux CSM de moelle osseuse. L'étude de la différenciation montrait un moins bon potentiel de différenciation, avec persistance d'une différenciation osseuse.

Les résidus chirurgicaux osseux peuvent être une source supplémentaire de CSM.