

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 5 Juin 2014
Par Melle Pauline VARLET**

**ALLORÉACTIVITÉ DES LYMPHOCYTES T DANS LA GREFFE DE CELLULES
SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES :
DÉVELOPPEMENT D'UN TEST *IN VITRO* PRÉDICTIF DE LA RÉACTION DU
GREFFON CONTRE L'HÔTE *IN VIVO*.**

Membres du jury :

Président :	Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL
Assesseurs :	Monsieur le Docteur Leonardo MAGRO Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA
Directeur de thèse:	Madame le Professeur Myriam LABALETTE

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 5 Juin 2014
Par Melle Pauline VARLET**

**ALLORÉACTIVITÉ DES LYMPHOCYTES T DANS LA GREFFE DE CELLULES
SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES :
DÉVELOPPEMENT D'UN TEST *IN VITRO* PRÉDICTIF DE LA RÉACTION DU
GREFFON CONTRE L'HÔTE *IN VIVO*.**

Membres du jury :

Président :	Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL
Assesseurs :	Monsieur le Docteur Leonardo MAGRO Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA
Directeur de thèse:	Madame le Professeur Myriam LABALETTE



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Patrick PELAYO
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Monique CAPRON
Professeur Salem KACET
Madame Stéphanie DAMAREY
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Edouard DANJOU

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Damien CUNY
Assesseurs : Mme Nadine ROGER
Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs : Monsieur André GENY

Liste des Professeurs des Universités :

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BAILLEUL	François	Pharmacognosie
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mlle	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie

Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mlle	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	BRUNET	Claude	Pharmacologie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
M.	BEGHYN	Terence	Chimie Thérapeutique 3
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARATO	Pascal	Chimie Thérapeutique 2
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mlle	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mlle	CHARTON	Julie	Chimie Organique
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mlle	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques

Melle	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mlle	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mlle	LEONHARD	Julie	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	LORIN-LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MOUTON	Nicolas	Physique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Melle	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mlle	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
Mme	THUILLIER	Pascale	Hématologie
Mme	VANHOUTTE	Geneviève	Biochimie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ABADIE	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

À mon Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL,

Durant l'ensemble de mon parcours pharmaceutique vous m'avez donné l'envie d'exercer la biologie médicale. Votre pédagogie et vos enseignements m'ont permis d'atteindre cet objectif. Merci d'avoir accepté avec beaucoup de gentillesse de présider cette thèse.

À ma directrice de thèse,

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Merci de m'avoir confié ce travail passionnant et ambitieux. Travailler avec vous est un réel plaisir et je me réjouis de continuer cette collaboration lors du Master II. Votre rigueur, vos connaissances et votre disponibilité m'ont permis de mener à bien ce projet. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est un sujet immunologiquement complexe. Votre intérêt pour cette thématique est une chance et une réelle source de motivation pour une interne désirant exercer dans le domaine de l'Histocompatibilité.

Soyez assurée de mes sincères remerciements et de ma profonde admiration.

À mes juges,

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Vous êtes à l'origine de ce projet unique et ambitieux. Votre dynamisme et votre investissement sont de réels atouts pour notre équipe de recherche. Ces travaux ont pu être réalisés grâce à votre étroite collaboration.

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Leonardo Magro,

Votre investissement auprès des patients impose le respect. J'ai beaucoup appris à vos côtés lors de mon externat en pharmacie.

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse, veuillez recevoir l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Je remercie tout le personnel du laboratoire d'Immunologie pour sa sympathie, son accueil et l'aide de chacun lors de ces derniers mois.

Jacques, tu as été un véritable soutien durant l'ensemble de mon travail de thèse. Je suis réellement admirative de ton investissement au sein de l'institut. Tu es inégalable dans la maîtrise de la cytométrie en flux. Merci pour tes conseils, ton aide précieuse et également ta grande sympathie.

J'adresse toute ma reconnaissance au personnel de l'unité d'immunologie cellulaire : Véronique L, Véronique B, Virginie, Emmanuelle, Malika qui m'ont encouragée et supportée au quotidien durant ce travail.

Carine, merci pour tes conseils, ta bonne humeur et tous les moments passés dans le laboratoire des cultures cellulaires.

Marie-Eve, je te remercie pour ton encadrement technique au début du projet.

Je tiens également à saluer l'ensemble du personnel de l'unité d'Histocompatibilité. Merci pour votre aide, travailler avec vous est un réel plaisir.

Isabelle, Vincent, Guillaume, Séverine, Sylvain et Olivier : merci pour votre disponibilité, vos conseils et enseignements dont j'ai bénéficié durant ces semestres d'Internat.

Merci enfin à tous les volontaires sains qui ont accepté avec engouement et curiosité de participer à cette étude.

À mes Parents,
*Merci pour votre soutien inconditionnel tout au long
de ces années d'études et pour votre Amour.*

À mon frère,
Pour notre complicité explosive mais tellement fusionnelle.

À mes Grands-parents,
Pour les bons moments passés à vos côtés.

À Caroline,
Merci pour cette amitié sincère.

À Aurélie et Laura
*Vous m'avez fait voyager durant ces derniers
mois par le récit de vos expériences
respectives à La Réunion et Madagascar
Vous me manquez énormément...*

À Benjamin,
*Je te remercie sincèrement pour ton aide
considérable durant l'ensemble de mes travaux.
Travailler avec toi est un réel plaisir.*

À Charlotte, Elise, Marie-Calixte, Valentine,
Pour votre joie de vivre et votre soutien.

À Sébastien,
Pour ta bonne humeur et ta compréhension.

À mes amis Lillois et Amiénois,

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- BAFF : *B-cell activating factor*, facteur d'activation des cellules B
- CD : Cellule dendritique
- CHRU : Centre hospitalier régional universitaire
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMN: Cellules mononuclées
- CMV : Cytomégalovirus
- CPA : Cellule présentatrice d'antigène
- CSH : Cellules souches hématopoïétiques
- CSP : Cellules souches périphériques
- CTL : Lymphocyte T cytotoxique
- DLI : *Donor Lymphocyte Infusion*
- FITC : Fluorescéine iso thio cyanate
- G-CSF : *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, Facteur de croissance granulocytaire
- GM-CSF : *Granulocyte macrophage–colony stimulating factor*, Facteur de croissance granulo-macrophagique
- GMP : *serum-free dendritic cell medium*, milieu de culture Cellgro®
- GvH : *Graft-versus-Host*, réaction du greffon contre l'hôte
- GvL : *Graft-versus-leukemia*, réaction du greffon contre les cellules leucémiques
- HLA : *Human leukocyte Antigen*, CMH humain
- HvG : *Host versus Graft*, réaction de l'hôte contre le greffon
- IFN- γ : Interféron-gamma
- IL : Interleukine
- KIR : *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*
- LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
- LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
- LMC : Leucémie myéloïde chronique
- LPS : Lipopolysaccharide
- Lc : Lymphocyte
- Lc T : Lymphocyte T
- mHA : Antigène mineur d'histocompatibilité
- MHA : Antigène majeur
- MLDCR : Réaction lymphocytaire mixte sensibilisée par des cellules dendritiques

MLR : Réaction lymphocytaire mixte

NK : Cellule *Natural Killer*

NKT : Cellule *Natural Killer T*

NOD2 : *Nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2*

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, cellules mononucléées du sang périphérique

PE : Phycoerythrine

PGE2 : Prostaglandine E₂

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SVF : Sérum de veau foetal

TAA : Antigènes associés à la tumeur

TCR : *T cell receptor*, récepteur des cellules T

TLR : *Toll like receptor*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

T_c : Lymphocyte T CD8+ cytotoxique

T_h : Lymphocyte T CD4+ helper

T_{CM} : Lymphocyte T mémoire centrale

T_{EM} : Lymphocyte T effecteur mémoire

T_{EMRA} : Lymphocyte T mémoire de différenciation terminale

T_N : Lymphocyte T naïf

USP : Unité de sang placentaire

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	16
1.1	L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES : Une immunothérapie adoptive.....	16
1.2	L'ALLORÉACTIVITÉ DES ANTIGÈNES MAJEURS D'HISTOCOMPATIBILITÉ.....	18
1.3	L'ALLORÉACTIVITÉ DES ANTIGÈNES MINEURS D'HISTOCOMPATIBILITÉ.....	21
1.4	LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE L'HÔTE.....	25
1.4.1	Description clinique.....	25
1.4.2	Physiopathologie de la GvH aiguë.....	27
1.4.3	Physiopathologie de la GvH chronique.....	37
1.5	LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE LA LEUCÉMIE.....	38
1.5.1	La réaction de GvL intimement lié à la GvH.....	38
1.5.2	Un effet GvL sans GvH ?.....	40
1.6	LES FACTEURS PRÉDICTIFS D'UNE GVH LORS D'UNE ALLOGREFFE HLA-IDENTIQUE.....	43
1.6.1	Les facteurs prédictifs de GvH liés aux caractéristiques du couple Donneur/Receveur :.....	43
1.6.2	Nouvelles perspectives dans la prévention de la GvH.....	46
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	49
3	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
3.1	ÉTUDE DE LA VIABILITÉ DES LYMPHOCYTES T EN CULTURE PROLONGÉE.....	50
3.1.1	Recueil des prélèvements.....	50
3.1.2	Culture cellulaire.....	51
3.2	LES RÉACTIONS LYMPHOCYTAIRES MIXTES SENSIBILISÉES.....	53
3.2.1	Sujets.....	53
3.2.2	Culture cellulaire.....	55
3.3	ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE PAR ÉVALUATION DES CAPACITÉS FONCTIONNELLES DES LYMPHOCYTES T.....	59
3.4	ANALYSE STATISTIQUE.....	61
4	RÉSULTATS.....	62
4.1	ÉTUDE DE LA VIABILITÉ LYMPHOCYTAIRE EN CONDITIONS BASALES DE CULTURE.....	62
4.1.1	Mortalité des lymphocytes T lors d'une culture prolongée en conditions basales.....	62
4.1.2	Devenir de la viabilité lymphocytaire sous l'effet de cytokines.....	63
4.2	ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE DES LYMPHOCYTES T EN SITUATION D'INCOMPATIBILITÉ EN ANTIGÈNES MAJEURS.....	65
4.2.1	Suivi des numérations lymphocytaires au cours de la culture.....	65
4.2.2	Approche fonctionnelle par analyse de la sécrétion d'IFN- γ	67
4.3	ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE DES LYMPHOCYTES T EN SITUATION D'INCOMPATIBILITÉ EN ANTIGÈNES MINEURS.....	71
4.3.1	Suivi des numérations lymphocytaires au cours de la culture.....	71
4.3.2	Approche fonctionnelle par analyse de la sécrétion d'IFN- γ	72
5	DISCUSSION.....	79
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	87
7	BIBLIOGRAPHIE.....	89

1 INTRODUCTION

1.1 L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES : Une immunothérapie adoptive.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue la seule alternative thérapeutique curative pour certaines hémopathies malignes, les déficits immunitaires primitifs sévères et certaines maladies héréditaires touchant l'hématopoïèse¹.

Dans les jours précédents l'allogreffe, le receveur reçoit un conditionnement associant une chimiothérapie myéloablative et une irradiation corporelle. Le traitement a pour objectifs de réduire le contingent résiduel de cellules malignes et de minimiser le risque de rejet du greffon (*Host versus Graft, HVG*) en éliminant au préalable les cellules immunocompétentes de l'hôte. À côté du conditionnement standard myéloablatif, un conditionnement atténué est de plus en plus administré car il permet l'accès à l'allogreffe de CSH à des patients fragiles avec comorbidités ou âgés^{2,3}. Selon l'agence de la biomédecine 53,6% des allogreffes réalisées en 2012, l'ont été avec un conditionnement non myéloablatif.

La greffe de CSH allogénique est définie comme immunothérapie adoptive (G.Mathé en 1965⁴). Le greffon va être capable de restituer une hématopoïèse complète chez le receveur grâce à son contenu en cellules souches hématopoïétiques⁵. Les cellules immunocompétentes du greffon (lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ naïfs et mémoires, lymphocytes B naïfs et mémoires, cellules NK) confèrent au receveur une immunité anti-infectieuse partielle et exercent un effet anti-tumoral⁶ dirigé contre les cellules leucémiques résiduelles⁷ (*Graft versus Leukemia, GvL*). Mais la contrepartie à ces deux effets bénéfiques est l'effet délétère majeur de l'allogreffe appelé réaction du greffon contre l'hôte⁸ (*Graft versus Host, GvH*).

C'est historiquement la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse, qui a été la première source de CSH à être utilisée. Elle est prélevée par aspiration au niveau de la crête iliaque ou éventuellement du sternum sous anesthésie générale.

À la fin des années 90, deux autres sources de CSH sont proposées:

- les cellules souches périphériques (CSP) obtenues par cytophérèse, après mobilisation préalable par facteur de croissance hématopoïétique notamment le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*).
- l'unité de sang placentaire (USP) issue du cordon ombilical, utilisée pour la première fois en 1988 par l'équipe de Gluckman E⁹.

La figure 1, issue des données de l'agence de la Biomédecine illustre l'évolution de la répartition des sources de CSH en France de 1996 à 2012.

En 2012, le nombre de prélèvements de CSH allogéniques s'élève à 1133 dans l'Hexagone (263 d'origine médullaire, 557 CSP et 313 USP). On observe une diminution de 2.3% par rapport à 2011, et pour la première fois une baisse des prélèvements d'origine périphérique ainsi qu'une tendance à l'augmentation des sources d'origine médullaire.

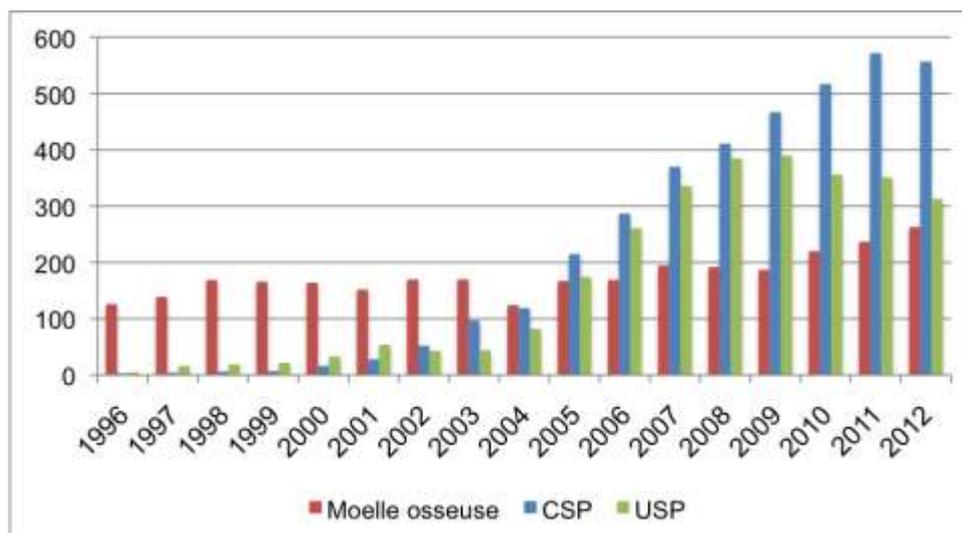


Figure 1: Répartition des différents types de greffons de CSH de 1996 à 2012 en France. D'après le rapport annuel de l'agence de la Biomédecine, 2012.

Ces différents types de greffons n'ont pas les mêmes caractéristiques; la nature et la richesse en cellules nucléées étant différentes. Ainsi, les CSP sont des prélèvements particulièrement riches avec une prédominance de cellules immunocompétentes. À l'inverse, le nombre de cellules dans le greffon de sang placentaire est beaucoup plus faible par rapport aux autres prélèvements. Les USP contiennent dix fois moins de progéniteurs hématopoïétiques que la moelle osseuse et cent fois moins que les CSP¹⁰, l'essentiel de ces cellules étant naïves.

Les différences génétiques entre le receveur et le donneur sont responsables d'incompatibilités antigéniques à l'origine du concept d'immunité de greffe.

Plusieurs systèmes peuvent être responsables d'une réaction allogénique :

- Le système des groupes sanguins ABO
- Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)
- Le système des antigènes mineurs

Plus de 90% des alloantigènes reconnus correspondent aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

1.2 L'ALLORÉACTIVITÉ DES ANTIGÈNES MAJEURS D'HISTOCOMPATIBILITÉ

L'extrême diversité (polymorphisme génétique) du CMH en fait le déterminant principal de l'acceptation (histocompatibilité) ou du rejet des greffes entre donneur et receveur différents, ce qui fut à l'origine de sa découverte par Jean Dausset et de sa dénomination. Le CMH humain est dénommé HLA (*Human Leukocyte Antigen*) car la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée comme un antigène leucocytaire.

Les gènes HLA classiques situés sur le chromosome 6, codent pour les molécules qui assurent la fonction de présentation de l'antigène et l'histocompatibilité. Le complexe est subdivisé en 3 régions qui contiennent chacune de nombreux autres gènes avec ou sans fonction immunologique. La région CMH de classe I comprend 3 gènes HLA de classe I dits "classiques", HLA-A, HLA-B, HLA-C. La région CMH de classe II comprend 3 paires de gènes HLA de classe II dits "classiques", HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). La région III ne renferme pas de gènes intervenant dans la présentation antigénique.

Les deux classes de gènes HLA classiques se caractérisent par un polymorphisme génétique multiallélique: il existe dans l'espèce humaine un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA classique (plusieurs centaines pour la plupart d'entre eux : ce sont les gènes les plus polymorphes de l'espèce humaine). Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA de classe I et de classe II, cette caractéristique le rend quasiment unique. Ce polymorphisme génétique se traduit par un polymorphisme de la protéine correspondante (allotype HLA) : chaque

allèle code pour une protéine caractérisée par une séquence en acides aminés particulière, les différences entre allotypes HLA étant concentrées sur la région correspondant à la niche à peptide (Figure 2).

Une autre caractéristique remarquable de ce système HLA est sa codominance et sa transmission «en bloc» : chez un individu donné, pour chaque gène, l'hétérozygotie se traduit par l'expression des deux allotypes portés chacun par un chromosome 6. L'ensemble des gènes HLA (haplotype HLA) de l'un des chromosomes 6 paternels et de l'un des chromosomes 6 maternels est donc transmis aux enfants.

L'expression des gènes du CMH classique dépend de leur classe, du type cellulaire et est influencée par des cytokines proinflammatoires. Pratiquement toutes les cellules nucléées expriment des molécules CMH de classe I. Leur densité varie selon le type cellulaire. On observe une forte densité (10^5 par cellule) sur les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, une densité intermédiaire (10^4) sur les cellules épithéliales et endothéliales, une densité faible voire nulle sur les cellules du pancréas, des glandes salivaires, les hépatocytes, la cornée, les hématies. La densité d'expression peut augmenter dans un contexte inflammatoire.

L'expression des molécules CMH de classe II à l'état basal est limitée aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, famille cellulaire composée par les cellules dendritiques, les monocytes/ macrophage et les lymphocytes B. Les cellules épithéliales et endothéliales n'expriment pas les molécules CMH de classe II excepté dans un contexte inflammatoire.

Chaque individu possède sans immunisation préalable un taux important de lymphocytes T capables de reconnaître des allotypes HLA différents. En effet, chaque allotype peut présenter aux lymphocytes T toute une collection de peptides issus de la dégradation de molécules du « soi », pourvu qu'ils respectent les conditions de taille et les critères d'ancrage de la niche à peptide. En raison du risque de développement de réponses immunes de forte intensité s'il existe des disparités entre les antigènes d'histocompatibilité du donneur et du receveur, les greffes de moelle osseuse et de CSP sont le plus souvent réalisées avec une identité au niveau allélique des antigènes du CMH de classe I et du CMH de classe II: HLA-DRB1, HLA-DQB1 (identité dite 10/10). Le typage HLA « allélique » est réalisé en technique de haute résolution¹¹.

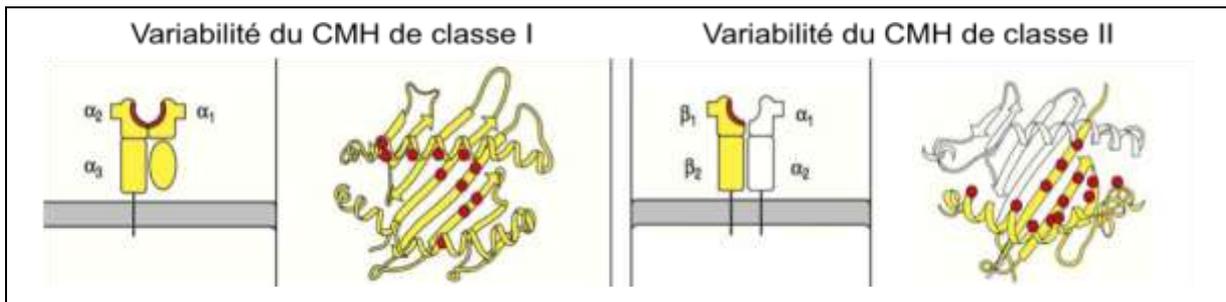


Figure 2 : Variabilité des différents allotypes du CMH de classe I et II au niveau de la niche à peptide. La molécule de HLA de classe I possède des sites hautement polymorphiques au niveau des domaines α_1 et α_2 . La molécule de HLA de classe II (molécule de DR représentée ici) doit sa variabilité essentiellement au domaine β_1 , la chaîne α étant beaucoup moins polymorphe.

Le choix du donneur se porte en priorité sur un membre de la fratrie HLA identique (donneur apparenté), dans ce cas on parle de greffe « géno-identique » ou « phéno-identique » si les haplotypes parentaux n'ont pu être déterminés. La probabilité d'identité HLA étant approximativement de 1 sur 4.

À défaut d'un donneur HLA compatible dans la fratrie, on recherche un donneur non apparenté volontaire et inscrit sur des fichiers nationaux et internationaux. Il s'agit d'une greffe « phéno-identique ».

Selon les données de l'Agence de la biomédecine, en 2012 sur les 1721 allogreffes réalisées en France, 1011 étaient des greffes non apparentées soit 58,7%. Parmi ces greffons non apparentés, 19,1% étaient issus de sang de cordon.

Le recours aux CSH de sang placentaire est intéressant, notamment en cas d'absence de donneurs géno ou phéno-identiques. En effet les exigences d'histocompatibilité sont moindres, expliquées entre autres par l'immaturation des lymphocytes du nouveau-né, et leur faible quantité dans le greffon¹². Une compatibilité 6/6, 5/6 et même 4/6, est acceptée avec un typage générique sur les locus A et B et allélique sur le locus DRB1 permettant d'obtenir une rémission durable¹³.

1.3 L'ALLORÉACTIVITÉ DES ANTIGÈNES MINEURS D'HISTOCOMPATIBILITÉ

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA) correspondent à des fragments peptidiques issus de la dégradation de protéines intracellulaires pour lesquelles il existe un polymorphisme génétique, mais n'appartenant pas au CMH. La présentation d'un antigène mineur est cependant restreinte par le CMH et fait intervenir l'alloréactivité indirecte. Les gènes codant les protéines qui présentent un polymorphisme allélique se situent sur divers chromosomes ce qui explique leur transmission autosomique ou gonosomique. Ainsi, l'antigène H-Y n'est exprimé que par les hommes puisque le gène qui le code est localisé sur le chromosome Y. Il existe aussi un polymorphisme des cytokines et de leurs récepteurs, ainsi que des antigènes du système KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*) présents sur les cellules NK. Le polymorphisme extensif du génome humain inclut par ailleurs des délétions de gènes. Le système immunitaire d'un individu porteur d'une délétion homozygote d'un gène n'a pas acquis de tolérance vis-à-vis du produit de ce gène. En cas de greffe allogénique, il peut alors reconnaître ce produit comme un alloantigène.

Dans le cas des mHA liés au polymorphisme allélique d'un gène, en général, un seul des deux allèles est immunogène et donc considéré comme immunodominant bien que chaque variant allélique soit exprimé et fonctionnel.

L'immunodominance est déterminée par la nature des allèles CMH de classe I et de classe II car de ceux-ci dépend la capacité de présentation des peptides issus de la dégradation des mHA aux lymphocytes T.

Prenons l'exemple de l'antigène HA-1, nonapeptide codé par le gène di-allélique *HMHA1* localisé sur le chromosome 19. Les deux allèles: HA-1H et HA-1R se distinguent par leurs séquences peptidiques. Seul l'antigène HA-1 codé par l'allèle HA-1H sera un alloantigène mineur hautement immunogénique présentable par les molécules HLA-A*02 :01 ; HLA-A*02 :06 ; HLA-B*40 :01 ; HLA-B60. À l'inverse, le peptide HA-1 codé par HA-1R n'est présentable par aucune molécule HLA¹⁴ (Figure 3).

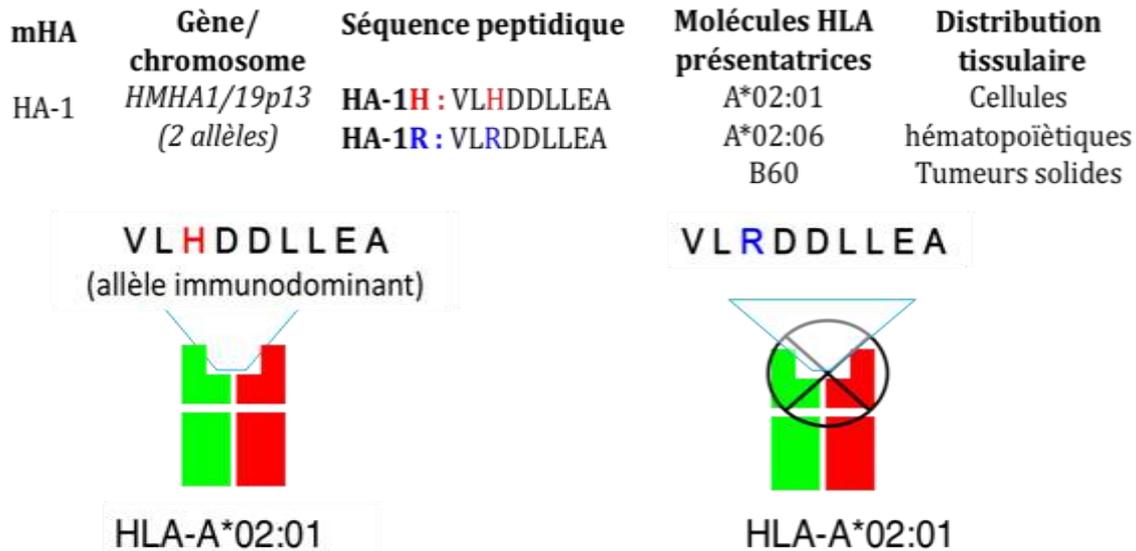


Figure 3 : Exemple représentatif des conditions de présentation d'un Ag mineur: HA-1. Seul l'allèle HA-1H est doté d'une immunogénicité et est immunodominant. Le peptide est présentable dans la niche à peptides d'une molécule d'histocompatibilité, sa présentation est restreinte par le HLA (HLA-A*02:01 ; HLA-A*02:06 ; HLA-B60).

Le chargement du peptide immunogène par le CMH de classe I se fait par mécanisme intracellulaire (Figure 4). Concernant la présentation des mHA par le CMH de classe II, elle s'explique par l'endocytose de protéines exogènes par les cellules présentatrices d'antigènes qui vont être dégradées et présentées aux lymphocytes T CD4+ par le CMH de classe II.

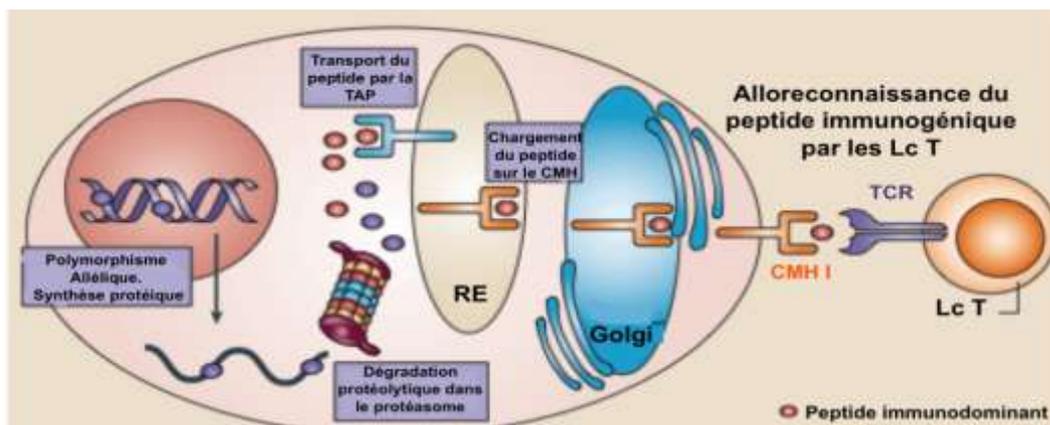


Figure 4 : Mécanisme de présentation des antigènes mineurs d'histocompatibilité par le CMH de classe I. D'après Bleakley et al.⁷. À la suite de la synthèse protéique, le peptide immunodominant va être produit par clivage protéolytique dans le protéasome. Ce dernier va être transporté par la TAP (*Transporter in antigen processing*) jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) où le peptide va être chargé sur le CMI de classe I au niveau de la niche à peptide. L'alloantigène va être exprimé à la surface de la cellule induisant l'alloreconnaissance par le récepteur des lymphocytes T (TCR).

Comme les antigènes majeurs d'histocompatibilité, les antigènes mineurs sont capables d'activer les cellules immunocompétentes de l'hôte. Les découvertes successives des mHA se sont faites à l'occasion de la mise en évidence de clones lymphocytaires T reconnaissant les cellules du receveur dans un contexte de GvH aiguë chez un patient ayant bénéficié d'une allogreffe HLA-identique.

L'allorecognition des mHA par les lymphocytes T du donneur lors d'une greffe HLA-identique est possible s'il existe un mismatch dans le système mHA considéré avec un receveur possédant l'allèle immunodominant et un donneur qui en est dépourvu. De plus, cela implique le partage entre le donneur et le receveur d'un allotype HLA capable de présenter cet antigène.

Grâce aux travaux de plusieurs équipes, on a pu identifier les caractéristiques de quelques mHA au niveau génétique, leurs associations avec les molécules HLA, leurs séquences peptidiques et leurs localisations tissulaires. Néanmoins, beaucoup des antigènes mineurs restent à ce jour inconnus. Lors de la sélection d'un donneur HLA-identique, on ne connaît pas le nombre total de mismatch en antigènes mineurs. Ceux-ci ne sont généralement pas pris en compte dans le choix du donneur. Cependant, selon leur distribution cellulaire, ils peuvent engendrer une réaction allogénique bénéfique (mHA exprimé par le système hématopoïétique et donc potentiellement sur les cellules tumorales résiduelles, effet GvL) ou au contraire une réaction allogénique délétère (mHA d'expression ubiquitaire et donc impliqués dans la GvH) (Tableau 1).

mHA	Gène / Chromosome	Molécule HLA de présentation	Séquence peptidique	Distribution tissulaire
ACC-1	<i>BCL2A1</i> /15q24.3	A*24:02	DYLQYVLQI, DYLQCVLQI	Système hématopoïétique Tumeurs solides
ACC-2	<i>BCL2A1</i> /15q24.3	B*44:03	KEFEDDIINW	Système hématopoïétique Tumeurs solides
ACC-4	<i>Cathepsin H</i> / 15q24–25	A*31:01	ATLPLLCAR	Ubiquitaire
ACC-5	<i>Cathepsin H</i> / 15q24–25	A*33:03	WATLPLLCAR	Ubiquitaire
HA-1	<i>HMHA1</i> /19p13	A*02:01 A*02:06 B*60	VLHDDLLEA	Système hématopoïétique Tumeurs solides
HA-2	<i>MYO1G</i> /7p13- p11.2	A*02:01	YIGEVLVSV	Système hématopoïétique
HA-3	<i>AKAP13</i> /15q24–25	A*01:01	VTEPGTAQY	Ubiquitaire
HA-8	<i>KIAA0020</i> / 9p24.2	A*02:01	RTLDKVLEV	Ubiquitaire
HB-1	<i>HMHB1</i> /5q32	B*44:02, B*44:03	EEKRGS L HVW, EEKRGS L YVW	Système hématopoïétique (LAL-B et EBV- BLCL)
LB-ADIR- 1F	<i>TOR3A</i> /1q25.2	A*02:01	SVAPALALFPA	Ubiquitaire Forte expression sur les cellules hématopoïétiques activées et tumeurs solides
C19orf48	<i>C19ORF48</i> /19q13	A*02:01	CIPPD S LLFPA	Ubiquitaire Tumeurs solides
ECGF1	<i>ECGF1</i> /2q13.33	B*07:02	RPHAIRRPLAL	Système hématopoïétique Tumeurs solides
HMSD	<i>HMSD</i> /18q21.33	B*44:02, B*44:03	<u>MEIFIEVFSHF</u>	Système hématopoïétique
LRH-1	<i>P2RX5</i> /17p13.2	B*07:02	TPNQRQNV C	Système hématopoïétique lymphoïde
PANE1	<i>CENPM</i> /22q13.2	A*03:01	<i><u>RVWDLPGVLK</u></i>	Système hématopoïétique
SP110	<i>SP110</i>	A*03:01	SLPRGTSTPK	Système hématopoïétique
UGT2B17	<i>UGT2B17</i> /4q13	A*29:02, B*44:03	<u>AELLNIPFLY</u>	Ubiquitaire
UGTB17		A*02:06	<u>CVATMIFMI</u>	
RPS4Y	<i>RPS4Y</i> /Yp11.3	B*52:01	TIRYPDPVI	Ubiquitaire avec reconnaissance par les CTL
UTY	<i>UTY</i> /Yq11	B*60	RESEEE S VSL	Ubiquitaire avec reconnaissance par les CTL
SMCY	<i>JARID1D</i> /Yq11	B*07:02	SPSVDKAR A EL	Ubiquitaire

LAL-B : cellules B des leucémies aiguës lymphoblastiques ; EBV-BLCL : lignée cellulaire lymphoïde B transformée par Epstein-Barr Virus ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques

Tableau 1 : Illustration des différentes caractéristiques de plusieurs antigènes mineurs actuellement bien décrits (non exhaustif). À chaque mHA correspondent une ou plusieurs molécules de restriction du système HLA capables de présenter l'antigène à la surface de différents types cellulaires. D'après Hambach et al.¹⁵ et Linscheid et al.¹⁶.

Les peptides immunogènes résultant d'une différence d'un acide aminé sont représentés en gras. Les peptides générés par un épissage alternatif sont en gras et soulignés. Les peptides générés par un décalage du cadre de lecture sont représentés en italique. Les peptides générés par une délétion sont soulignés. Les peptides générés par l'insertion d'un codon terminal sont en italiques et soulignés.

1.4 LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE L'HÔTE

Principale complication de l'allogreffe, la réaction du greffon contre l'hôte est responsable de 15 à 40% de la mortalité au cours du premier trimestre suivant la greffe de CSH et d'une morbidité importante pouvant atteindre 50%.

1.4.1 Description clinique

On distingue deux formes cliniques de GvH ayant une cinétique et une physiopathologie propre : la GvH aiguë survenant dans les premières semaines suivant l'allogreffe, classiquement dans les 100 premiers jours et la GvH chronique qui se développe de manière retardée généralement au delà des 100 jours après conditionnement myéloablatif. En effet, il est désormais bien reconnu que des signes cliniques propres à la GvH chronique peuvent apparaître dans les 100 jours suivant la greffe, la GvH aiguë pouvant coexister avec des manifestations de GvH chronique¹⁷. À l'inverse, à la suite d'une allogreffe de CSP ou d'un conditionnement non myéloablatif, la GvH aiguë peut se manifester au delà des 100 jours.

Les organes cibles de la GvH aiguë sont essentiellement la peau (éruptions plus ou moins étendues pouvant aller jusqu'à une épidermolyse bulleuse dans les formes sévères), le tube digestif (diarrhées, douleurs abdominales, vomissements), le foie (le plus souvent sous forme de cholestase) et le poumon (pneumopathies interstitielles). La gravité des atteintes tissulaires étant variable, Glucksberg¹⁸ propose une classification en stades de gravité (Tableau 2) permettant de définir des grades de GvH aiguë allant de I à IV (Tableau 3). Cette classification est utilisée notamment à des fins de pronostic sur la survie.

Ainsi, pour une GvH aiguë de grade III, on observe une survie à 5 ans de 25% contre 5% pour une manifestation de grade IV¹⁹.

Stade de gravité	Peau	Foie	Intestin
0	Absence de rash	Bilirubine < 2mg/dl	Aucune atteinte
1	Eruption maculo-papuleuse < 25% de la surface corporelle	Bilirubine entre 2 et 3 mg/dl	Diarrhée > 500 ml par jour
2	Eruption maculo-papuleuse entre 25% et 50% de la surface corporelle	Bilirubine entre 3 et 6 mg/dl	Diarrhée > 1000 ml par jour
3	Erythrodermie généralisée	Bilirubine entre 6 et 15mg/dl	Diarrhée > 1500 ml par jour
4	Erythrodermie généralisée avec formation bulleuse, desquamation	Bilirubine > 15 mg/dl	Diarrhée > 1500 ml par jour, douleur abdominale sévère avec ou sans iléus

Tableau 2 : Critères de classification des stades de gravité des trois principaux organes cibles touchés par la GvH aiguë. D'après Glucksberg et al.¹⁸.

Stade de gravité / Grade	Peau	foie		Intestin	Altération de l'état général
I	1 à 2	0		0	0
II	1 à 3	1	et/ou	1	Discrète
III	2 à 3	2 à 3	et/ou	2 à 3	Marquée
IV	2 à 4	2 à 4	et/ou	2 à 4	Sévère

Tableau 3 : Grades de la classification de Glucksberg en fonction de l'altération des principaux organes touchés lors de la GvH aiguë et de l'altération de l'état général. D'après Glucksberg et al.¹⁸.

La réaction de GvH chronique revêt un tableau clinique plus polymorphe car elle peut toucher tous les organes et s'apparente dans sa symptomatologie à un syndrome de type auto-immun²⁰. Les principaux organes cibles sont comme pour la GvH aiguë : la peau, le foie, les intestins mais également les reins, les muqueuses, les glandes lacrymales... On observe des manifestations de type sclérodermie, cirrhose biliaire primitive, bronchiolite oblitérante, syndrome de Gougerot-Sjögren. Sa classification distingue les formes limitées des formes extensives¹⁷.

La maladie du greffon contre l'hôte est également à l'origine de la destruction des niches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse ayant pour conséquence une augmentation des infections due aux délais importants de reconstitution de l'immunité²¹. Cette réaction serait médiée par l'action des lymphocytes T CD4⁺ du donneur sur les ostéoblastes de l'hôte par des mécanismes non clairement identifiés

qui sont autonomes de la reconnaissance du CMH de classe II, ce dernier n'étant pas exprimé par les ostéoblastes²².

1.4.2 Physiopathologie de la GvH aiguë

En 1966, Billingham²³ définit trois conditions nécessaires au développement d'une réaction de GvH : le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes, le receveur doit posséder des alloantigènes absents chez le donneur et l'hôte doit être immunodéprimé.

Les alloantigènes les plus générateurs de GvH sont les molécules du CMH, la fréquence de la maladie du greffon contre l'hôte étant directement liée au mismatch en antigènes de classe I (A,B,C) et II (DRB₁, DQB₁)²⁴.

Malgré les précautions de compatibilité en antigènes majeurs d'histocompatibilité, on observe une GvH aiguë dans 40 à 60% des allogreffes²⁵. Ainsi, dans les allogreffes de CSH HLA-identiques, les antigènes mineurs d'histocompatibilité constituent les cibles allogéniques et sont exprimés aussi bien par les cellules saines que par les cellules malignes du receveur. Ces alloantigènes sont reconnus par les cellules immunocompétentes du greffon.

En se basant sur des données expérimentales obtenues par l'étude de la GvH aiguë dans des modèles murins et canins, Ferrara et *al.*²⁰ proposent un schéma de cette réaction immunologique complexe en trois phases (Figure 5).

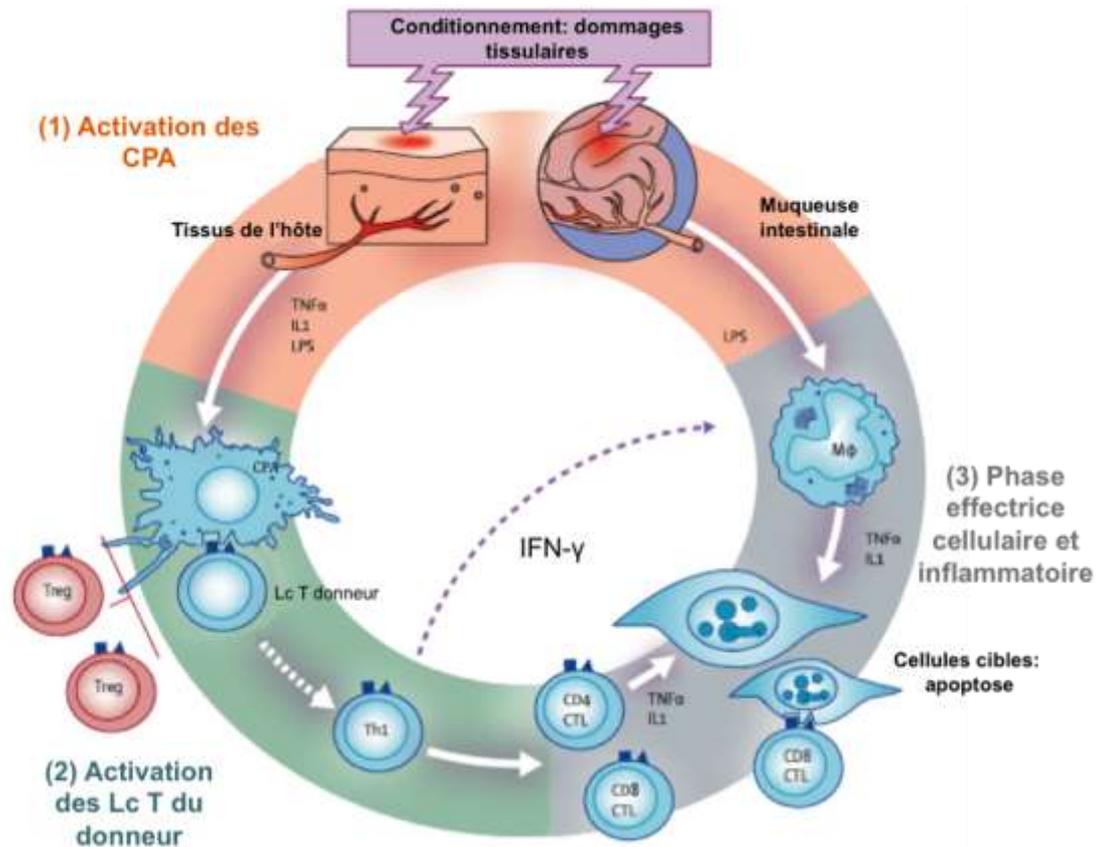


Figure 5 : Physiopathologie de la GvH aiguë. D'après Ferrara et al.²⁰.

Description en trois étapes : l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) suite au conditionnement, l'activation des lymphocytes T du donneur suivie de leur prolifération et leur différenciation et la phase effectrice cellulaire et inflammatoire au niveau des tissus cibles de la GvH.

- **La phase pré-greffe et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes:**

Au niveau des tissus cibles du receveur, les lésions cellulaires engendrées par les traitements de la pathologie maligne sous-jacente et le conditionnement pré-greffe sont à l'origine de la production de signaux de danger, véritables catalyseurs de la réaction de GvH. Les chimiokines, cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) et facteurs de croissance (GM-CSF) vont déclencher la maturation et accroître l'immunogénicité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de l'hôte ; famille cellulaire constituée par les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B.

Les cellules dendritiques myéloïdes représentent la population cellulaire la plus efficace pour induire une GvH aiguë^{26,27}. Les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B ne possèdent pas un rôle majeur dans l'induction de la GvH, des

études ont même montré que leur déplétion engendre une exacerbation de la réaction de GvH^{28,29}.

L'activation des CPA du receveur se traduit par l'augmentation de la présentation des antigènes majeurs d'histocompatibilité et mineurs ainsi que la surexpression des molécules de costimulation telles que le CD80 (B7.1), le CD86 (B7.2) le CD83 (spécifique des cellules dendritiques myéloïdes matures), le CD40 et les molécules d'adhésion comme ICAM. L'expression du CCR7 (récepteur de chimiokines CCL19 et CCL21), à la suite de l'activation des CPA, permet leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'alloantigène aux lymphocytes T par un mécanisme de reconnaissance directe (Figure 6.A).

Les CPA du donneur jouent également un rôle dans la réaction de GvH en présentant des alloantigènes du receveur aux cellules T alloréactives du donneur. Il s'agit alors d'un mécanisme d'alloréconnaissance indirecte (Figure 6.B). En effet, une fois la réaction initiée, elle est indiscutablement entretenue par les CPA dérivées des CSH du donneur^{30,31}. Des études sur modèle murin ont montré que les réactions de GvH aiguë médiées par les lymphocytes T CD4⁺ sont induites par les CPA de l'hôte et du donneur^{26,32}. Par ailleurs, les CPA de l'hôte initient la réponse T CD8⁺, processus qui sera amplifié par les cellules dendritiques du donneur³³ qui vont activer les cellules T CD8⁺ par un mécanisme de présentation croisée de l'antigène³².

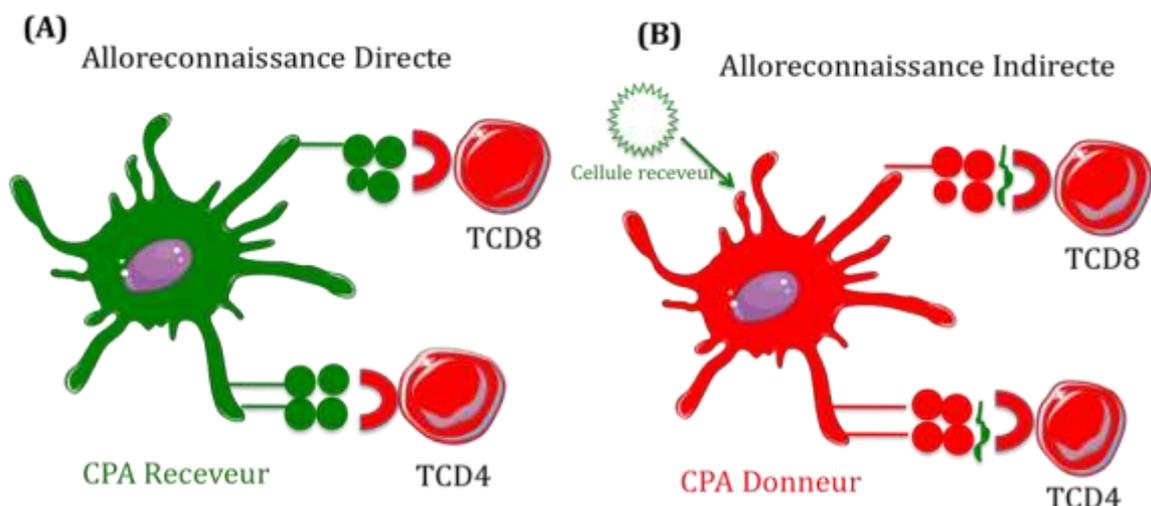


Figure 6 : Mécanismes de reconnaissance antigénique lors d'une allogreffe de CSH. **(A)** Alloréconnaissance directe des antigènes présentés par les CD du receveur aux lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ du donneur. **(B)** Reconnaissance indirecte des alloantigènes présentés par les CD du donneur aux lymphocytes T du donneur.

Au niveau de la muqueuse gastro-intestinale les dommages tissulaires vont être responsables d'un relargage sérique d'endotoxines bactériennes pro-inflammatoires par un phénomène de translocation. C'est le cas du lipopolysaccharide (LPS) véritable promoteur d'une réponse inflammatoire qui stimule la production de $\text{TNF-}\alpha$ et d'IL-1 par des cellules tissulaires de l'hôte (notamment les macrophages) et contribue à intensifier la maturation des CPA via le *Toll-like receptor 4* (TLR_4)^{20,34} (Figure 7).

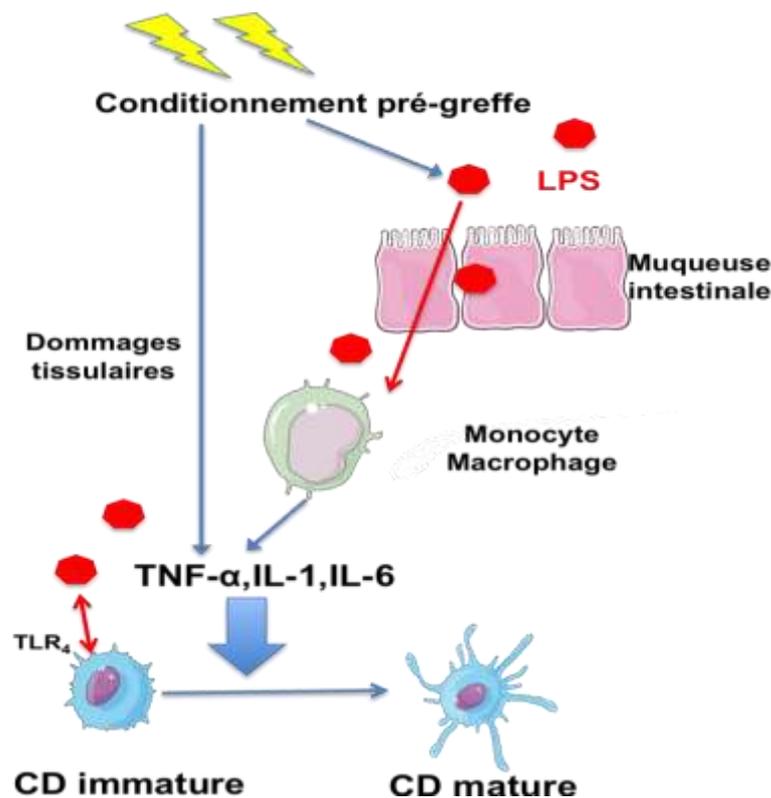


Figure 7 : Mécanisme d'activation des cellules présentatrices d'antigènes lors de la GvH aiguë.

- **La phase d'activation des cellules immunocompétentes du donneur, leur prolifération et leur différenciation :**

- Les populations T conventionnelles CD4^+ et CD8^+ :

La surexpression des molécules du CMH de classe I et du CMH de classe II à la surface des CPA activées suite à l'orage cytokinique va respectivement induire une activation des lymphocytes T CD8^+ et T CD4^+ par interaction avec le récepteur des

cellules T (*T Cell Receptor*, TCR), notamment en cas de mismatch. En situation d'allogreffe HLA identique, les lymphocytes T du donneur sont stimulés par la présentation des mHA à la surface des CPA activées.

Les lymphocytes T CD4⁺ vont être activés par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe II ainsi que des signaux de costimulation (CD40-CD40 ligand, B7.1-CD28), molécules d'adhésion (ICAM-LFA3) et cytokines (TNF- α , IL-6)³⁵ (Figure 8). Le blocage de ces signaux de costimulation sur des modèles murins a montré une réduction de la GvH³⁶. De cette activation résulte une cascade de réactions intracellulaires conduisant à la production de cytokines et leurs récepteurs et aboutissant à la prolifération et la différenciation lymphocytaire.

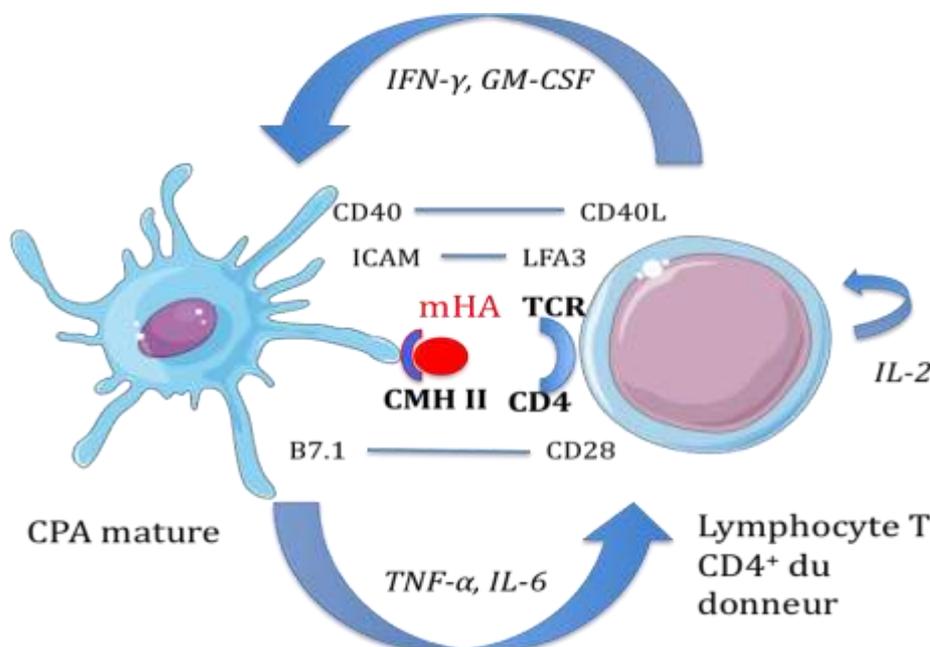


Figure 8 : Représentation de la synapse immunologique entre les lymphocytes T CD4⁺ du donneur et une CPA activée dans le cadre d'une allogreffe HLA identique. Présentation des mHA par les molécules de CMH de classe II avec participation de signaux de costimulation, de molécules d'adhésion et de cytokines. Schéma inspiré de l'article de Kolb et al.³⁵.

Les lymphocytes T CD8⁺ participent également très activement au mécanisme de GvH par reconnaissance des mHA présentés par le CMH de classe I à la surface des CPA. En effet, lors de déplétion sélective de greffons en cellules T CD8⁺, on observe une diminution de la sévérité de la GvH mais en contrepartie, le risque de rejet de greffe est augmenté³⁷.

L'activation et la différenciation des cellules T CD8⁺ en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) se fait suite à l'interaction avec la CD activée ou par interaction avec les CPA et coopération avec les cellules T CD4⁺.

Au sein des lymphocytes T CD4⁺ comme dans les lymphocytes T CD8⁺ la contribution des sous-populations T naïves et mémoires dans le déroulement de la réaction du greffon contre l'hôte est une question importante. En effet, ces sous-populations ne possèdent pas la même diversité de répertoire immunologique, les mêmes exigences d'activation, ont des capacités de domiciliation et des propriétés fonctionnelles différentes.

Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves et mémoires peuvent être caractérisées par l'expression de différents marqueurs membranaires CD62L (L-Sélectine), CCR7 (récepteur de chimiokines) et CD45RA (isoforme de haut poids moléculaire de la tyrosine-phosphatase panleucocytaire CD45). L'analyse de l'expression CD62L est plus difficile à interpréter du fait de son expression encore importante sur certaines cellules T mémoires³⁸(Figure 9).

L'utilisation du co-marquage CCR7/CD45RA permet de distinguer nettement 4 fractions pour les lymphocytes T CD8⁺ et 3 fractions (peu ou pas de sous-population au stade de différenciation terminale) pour les lymphocytes T CD4⁺ :

- LcT naïf (T_N) : CD45RA⁺ CCR7⁺,
- LcT mémoire centrale (T_{CM}) : CD45RA⁻ CCR7⁺
- Lc T mémoire de différenciation terminale (T_{EMRA}) : CD45RA⁺ CCR7⁻
- LcT effecteur mémoire (T_{EM}) : CD45RA⁻ CCR7⁻

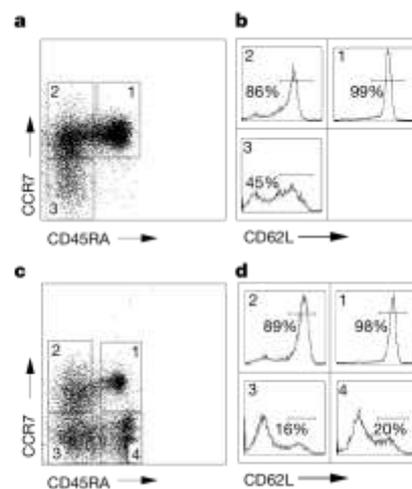


Figure 9 : Définition des sous-populations naïves (1), mémoires centrales (2), effectrices mémoires (3) et de différenciation terminale (4) selon l'expression du CCR7 et du CD45RA. Comparaison avec l'expression du CD62L sur la population T CD4⁺ (a,b) et sur la population T CD8⁺ (c,d). D'après Sallusto et al.³⁸.

L'étude de Sallusto et *al.*³⁸ met en évidence des fonctions effectrices différentes au sein des fractions lymphocytaires. Ainsi, les populations T_N et T_{CM} vont sécréter préférentiellement de l'IL-2, quant aux T_{EM} ils sont principalement à l'origine de la production d'INF- γ , IL-4 et IL-5.

Pour rencontrer l'antigène, les lymphocytes T naïfs du donneur migrent précocement dans les organes lymphoïdes secondaires du receveur pour interagir avec les CPA matures. Ils vont alors proliférer et se différencier en cellules T helper (Th)/T cytotoxiques (Tc) et migrer secondairement dans les tissus de la GvH aiguë.

Les données recueillies chez l'Homme *ex vivo*, ont montré que chaque sous population T CD4⁺ et CD8⁺ aurait la capacité de répondre à une allostimulation et d'engendrer une production d'INF γ et de granzyme B/perforine³⁹.

Ces différentes fractions lymphocytaires, après activation, vont proliférer et sécréter des cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) et Th17 (IL-17). Bien que la différenciation fonctionnelle de type Th1 soit impliquée de manière évidente dans la GvH aiguë, la balance entre les cytokines de type Th1/Th2 ainsi que la réponse Th17 sont importantes dans la pathogénèse mais restent encore mal précisées^{40,41}.

L'IL-2 facteur de croissance par excellence des cellules T, reste la principale cible des traitements de la GvH (inhibiteurs de la calcineurine: ciclosporine, tacrolimus; anticorps monoclonaux antagonistes du récepteur à l'IL-2). Cependant, certaines études montrent son rôle dans la génération et la régulation des populations T régulatrices CD4⁺ CD25^{High} (Treg). Ces traitements peuvent donc de manière non-intentionnelle, interférer avec le développement d'une réaction de tolérance à long terme⁴².

- Les autres populations immunocompétentes:

Aux cotés des cellules T alloréactives conventionnelles, les travaux expérimentaux et études cliniques réalisés ces vingt dernières années ont permis de mettre en évidence la participation d'autres populations immunocompétentes : LcT régulateurs,

LcT CD4⁻ CD8⁻ doubles négatifs, les LcT $\gamma\delta$, les lymphocytes NK (*Natural Killer*) et les cellules NKT.

Les Lc T CD4⁺ régulateurs (Treg) restent les plus connus et étudiés. Ils sont caractérisés par le phénotype CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ CD127^{low}, et représentent 5 à 10% des cellules périphériques CD4⁺. Ces cellules présentes dans un greffon hématopoïétique sont susceptibles de moduler l'alloréactivité post-greffe.

Des études menées sur divers modèles montrent leur rôle sur la régulation du mécanisme de GvH par le biais de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, ils permettent d'inhiber les fonctions des CPA grâce au rétrocontrôle exercé sur l'expression des molécules de costimulation. Ils sont capables par l'induction de l'enzyme IDO de dépléter le microenvironnement en acides aminés essentiels. En raison de leur expression constitutive en CTLA-4, le contact cellulaire avec les CPA exprimant le CD80/CD86 va induire une diminution de l'alloréactivité via la sécrétion d'IL-10 (cytokine pro-inflammatoire) et d'adénosine (inhibe l'activation des cellules T). La sécrétion d'IFN- γ étant considérée comme autocrine, elle va permettre l'auto-activation des T reg⁴³ (Figure 10). Ils interviennent non pas sur la phase d'activation lymphocytaire mais vont réduire la prolifération de ces derniers. Les T reg vont induire la tolérance du greffon sans agir sur l'effet GvL⁴⁴.

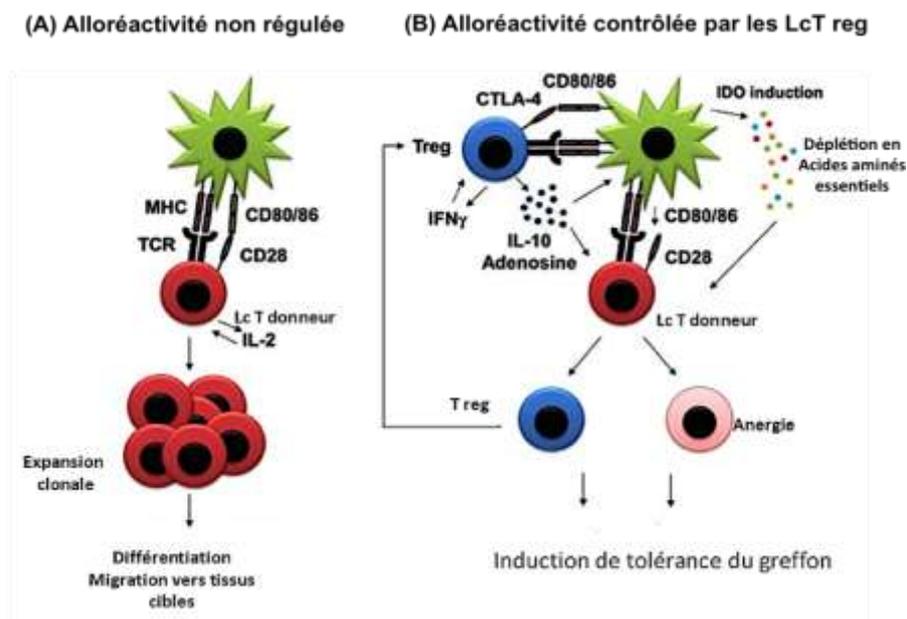


Figure 10 : Contrôle de l'alloréactivité des cellules T du donneur par les lymphocytes T régulateurs. D'après Juvet et al.⁴³.

(A) Schéma de l'alloréactivité non régulée. (B) Contrôle de l'alloréactivité par les Lc T reg permettant la réduction de la prolifération lymphocytaire.

Les lymphocytes NK du donneur émergent lors de la phase de reconstitution post-greffe du système immunitaire. Ils sont capables de médier un effet anti-tumoral notamment vis-à-vis des leucémies myéloïdes dans un contexte d'incompatibilité Donneur/Receveur pour les récepteurs KIR tout en prévenant la survenue d'une GvH par destruction des CPA⁴⁵.

Les cellules NKT ($\alpha\beta$ TCR⁺ CD4⁺ DX5⁺) constituent une autre population ayant montré des capacités d'inhibition de la GvH par un mécanisme dépendant de l'IL-4 (cytokine régulatrice fortement sécrétée par ces cellules) différent de celui des Treg⁴⁴.

- **La phase de destruction des tissus de l'hôte par des mécanismes effecteurs cellulaires et inflammatoires :**

La phase effectrice de la GvH aiguë s'illustre par une cascade complexe de mécanismes cellulaires et inflammatoires aboutissant à la destruction des tissus cibles et à l'amplification du mécanisme par la libération de signaux de danger.

On compte parmi les principaux effecteurs cellulaires les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules NK. La migration des lymphocytes du donneur dans les tissus cibles de l'hôte (foie, peau, poumons, intestin) est liée à la présence de chimiokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11) surexprimées dans ces tissus en conditions inflammatoires. Les cellules T effectrices qui expriment les ligands de ces chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5) vont infiltrer ces organes⁴⁶. L'expression d'intégrine comme $\alpha_4\beta_7$ et leur ligand MADCAM1 est également important dans le phénomène de migration des CTL du donneur vers la muqueuse intestinale.

Suite à cette migration orientée, les cellules effectrices peuvent engendrer une destruction tissulaire par une activité cytotoxique directe et le recrutement d'autres leucocytes. La voie Fas/FasL (Figure 11.a) cible principalement les hépatocytes (lesquels expriment largement Fas à leur surface) alors que la lyse cellulaire au niveau du tractus intestinal et de la peau passe davantage par les voies de la perforine/granzyme (Figure 11.b) et de TRAIL⁴⁷.

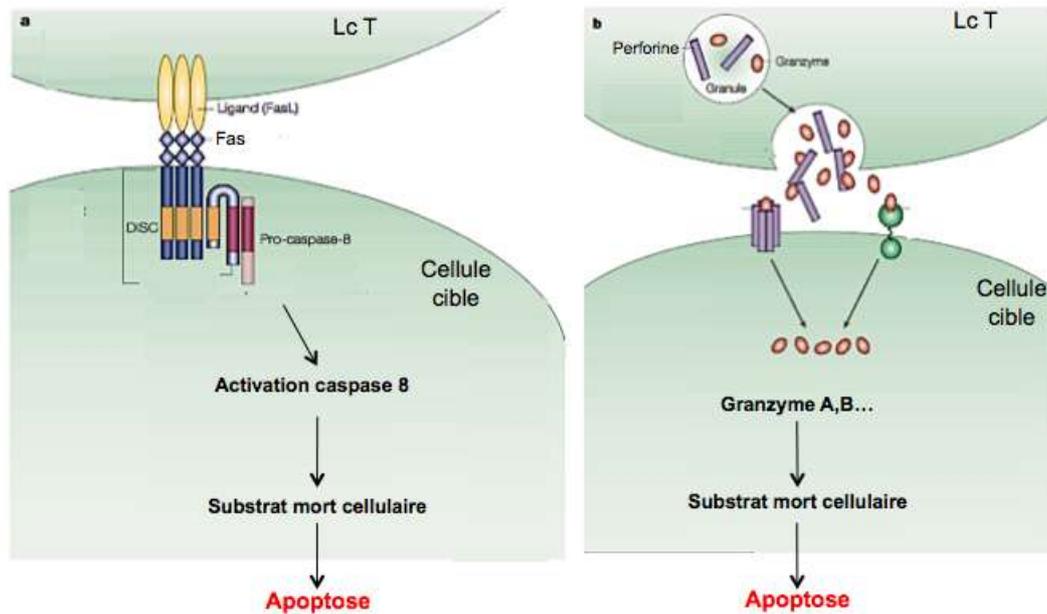


Figure 11 : Principaux mécanismes de cytotoxicité dans la GvH aiguë. D'après Van den Brink et al.⁴⁷.

(a) Mécanisme Fas-Fas L prédominant au niveau des hépatocytes. (b) Mécanisme perforine-granzyme touchant préférentiellement la peau et le tractus gastro-intestinal.

Par ailleurs, les effecteurs inflammatoires comme le $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 sont à l'origine de dommages tissulaires. Ils activent les CPA et potentialisent la présentation des alloantigènes, recrutent les effecteurs cellulaires par l'induction de chimiokines inflammatoires et causent directement l'apoptose et la nécrose des tissus cibles.

La synthèse de la réaction de GvH faite par l'équipe de Welniak⁴⁸ illustre l'auto-renouvellement de ce mécanisme et le rôle central des lymphocytes T dans la reconnaissance des alloantigènes conduisant à un effet délétère sur les tissus sains de l'hôte mais également à un effet bénéfique anti-tumoral (Figure 12).

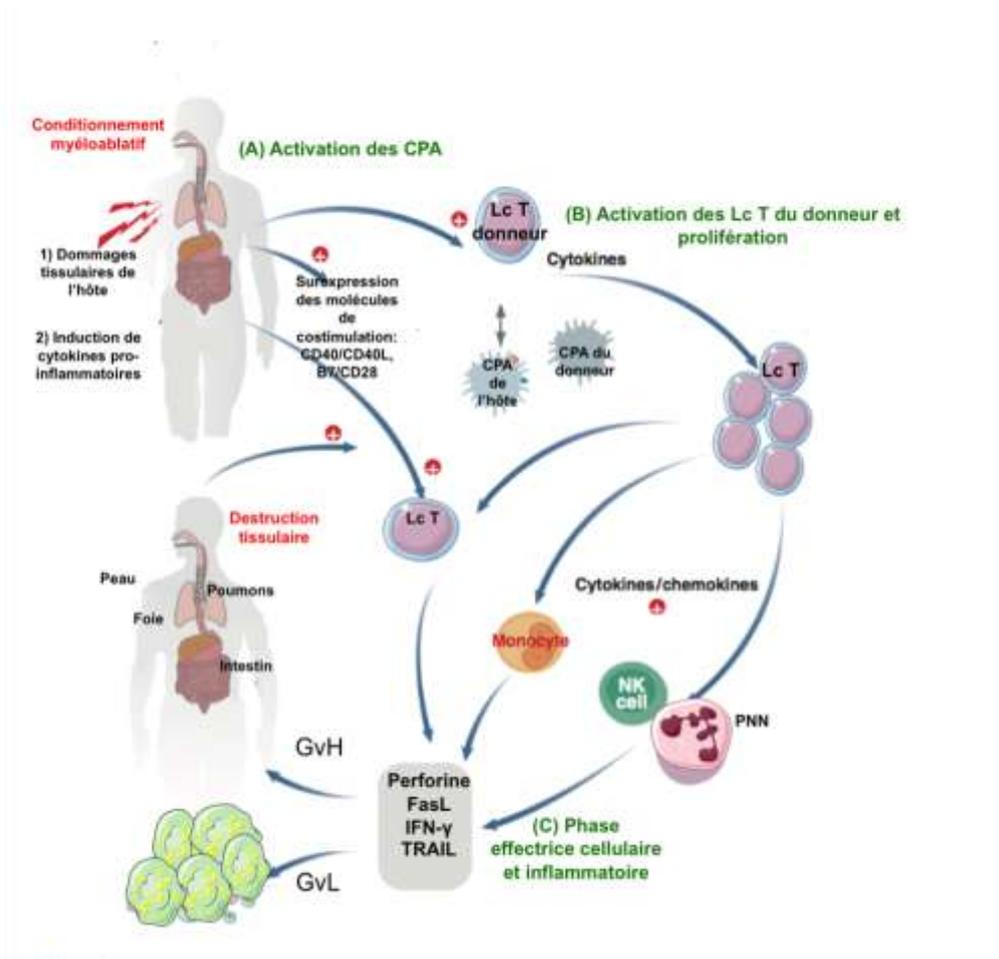


Figure 12 : Physiopathologie de la réaction de GvH et GvL. D'après Welniak et al.⁴⁸. Les manifestations de GvH et GvL sont les conséquences d'un mécanisme immunologique complexe schématiser en trois étapes : l'activation des CPA, l'activation et la prolifération des lymphocytes T du greffon et les conséquences inflammatoires sur les cellules cibles de l'hôte conduisant à l'amplification du mécanisme.

1.4.3 Physiopathologie de la GvH chronique

La physiopathologie de la GvH chronique est beaucoup moins documentée que celle de la GvH aiguë à cause de sa complexité. Les similarités cliniques observées entre la GvH chronique et les maladies auto-immunes suggèrent une dérégulation du système immunitaire. Ainsi, à l'alloréactivité s'ajoute une composante auto-immune probablement liée à un défaut d'éducation thymique des lymphocytes T issus de la lymphopoïèse à partir des cellules souches du greffon. Il y aurait un défaut de sélection négative des lymphocytes T autoréactifs et une diminution de la production de lymphocytes T régulateurs⁴⁹. La destruction des cellules épithéliales thymiques

lors d'épisodes de GvH aiguë pourrait favoriser le développement de la GvH chronique.

L'homéostasie du compartiment B est également perturbée en cas de GvH chronique ce qui suggère un rôle de la cellule B et des auto-anticorps dans la physiopathologie. En effet, une diminution significative des lymphocytes B naïfs associée à une expression importante du facteur d'activation des cellules B (BAFF) ont été mises en évidence lors de la réaction de GvH chronique⁵⁰. De plus, l'introduction du Rituximab (anticorps anti-CD20) dans l'arsenal thérapeutique de la GvH chronique a permis d'obtenir une réponse pour 50% des sujets en échec de traitement et engendre une reconstitution du compartiment B naïf avec diminution de l'expression de BAFF⁵¹.

1.5 LA RÉACTION DU GREFFON CONTRE LA LEUCÉMIE

1.5.1 La réaction de GvL intimement lié à la GvH

En 1979, l'équipe de Weiden et *al.*^{52,53} met en évidence que la probabilité de rémission pour les patients ayant reçu une allogreffe est augmentée en cas de GvH. Ces observations, confirmées par des études européennes et internationales^{54,55}, sont aujourd'hui très largement reprises.

L'effet anti-leucémique intrinsèque à l'allogreffe de CSH ainsi que la GvH se fait majoritairement en fonction des différences génétiques entre le donneur et le receveur.

On explique d'ailleurs le taux élevé de rechute lors de greffes syngéniques par la similarité du patrimoine génétique qui ne permet plus l'induction d'un effet GvH et d'un effet anti-tumoral⁵⁴.

Les lymphocytes T jouent un rôle crucial dans ces deux mécanismes et toute manipulation préalable du greffon visant à minimiser la GvH va avoir également un impact négatif sur la GvL. Ainsi, la déplétion en lymphocytes T du greffon va prévenir la GvH sévère mais majore le risque de rechute ainsi que le risque de rejet de greffe^{56,57,58,59} (Figure 13). De plus, en réduisant le taux de cellules immunocompétentes, le risque d'infections sera augmenté ainsi que les délais de reconstitution du système immunitaire.

À l'inverse, l'efficacité de l'administration de lymphocytes T du donneur (*Donor Lymphocyte Infusion* ou DLI) atteste de l'action allogénique des cellules T dans l'effet anti-leucémique.

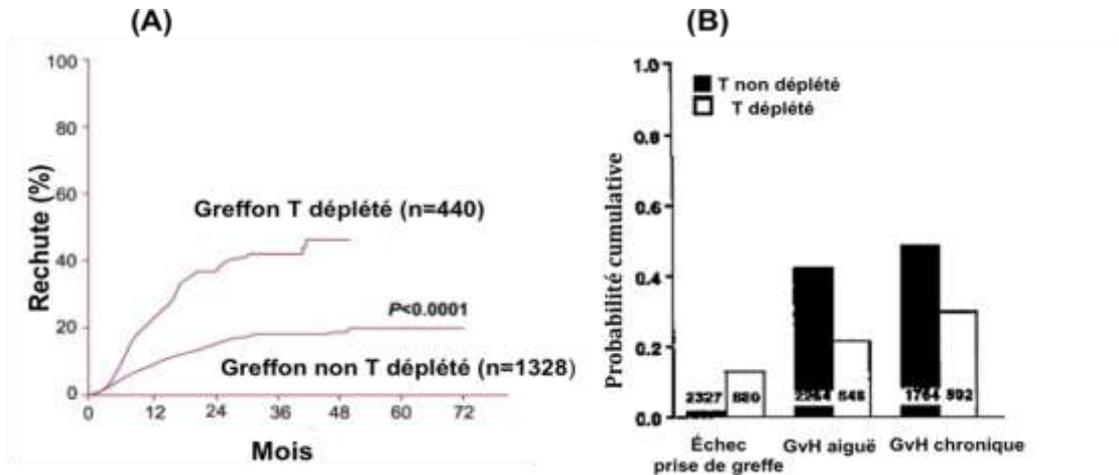


Figure 13 : Effet de la déplétion en lymphocyte T du greffon lors de l'allogreffe HLA identique. D'après Marmont et al.⁵⁷. **(A)** Probabilité non ajustée de rechute après greffe apparentée en cas de leucémie aiguë ou leucémie myéloïde chronique en première rémission. Différence significative entre la probabilité de rechute en cas de déplétion cellulaire T ou de non déplétion. **(B)** Probabilité des complications relatives à l'allogreffe et comparaison de leurs survenues en cas de déplétion T ou non.

En condition HLA identique, les lymphocytes T du donneur sont les principaux acteurs de la reconnaissance des alloantigènes mineurs présents sur les cellules malignes.

Les antigènes du système mineur d'histocompatibilité tels que HA-1, HA-2, HB-1, ACC-1, ACC2 exprimés uniquement par les cellules hématopoïétiques et par conséquent sur les cellules leucémiques sont considérés comme des cibles antigéniques potentielles pour l'effet anti-leucémique et pourraient donc théoriquement constituer des cibles pour un effet GvL sans GvH.

Prenons l'exemple du gène *BCL2A1* (membre de la famille de bcl-2, gène anti-apoptotique) qui code pour les mHA ACC-1 et ACC-2. Il va être surexprimé lors d'hémopathies malignes faisant ainsi de ces antigènes mineurs une cible de choix pour les cellules T alloréactives du greffon.

Concernant les mHA ubiquitaires exprimés aussi bien à la surface des cellules hématopoïétiques qu'au sein des tissus épithéliaux, ces alloantigènes peuvent aussi bien induire un effet anti-leucémique qu'une réaction de GvH⁷ (Figure 14).

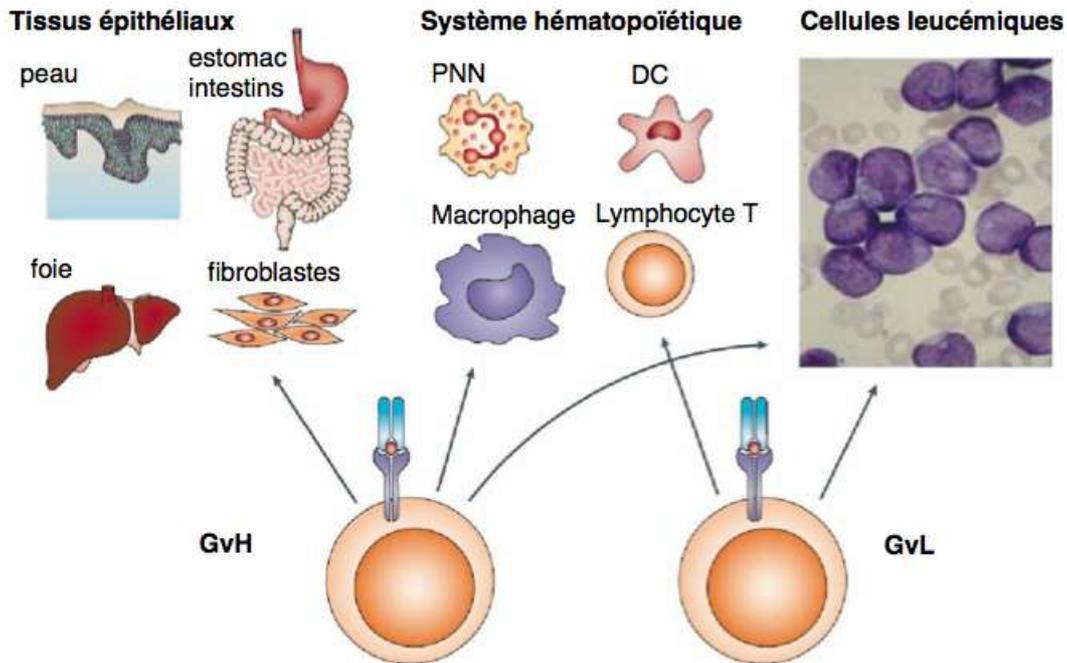


Figure 14 : Dualité de l'alloreconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité par les cellules alloréactives T contenues dans le greffon. D'après Bleakley et al.⁷. À l'effet anti-leucémique recherché -reconnaissance d'alloantigènes mineurs situés sur les cellules tumorales et restreints au système hématopoïétique- s'oppose l'effet délétère de la réaction du greffon contre l'hôte si ces alloantigènes sont d'expression ubiquitaire.

1.5.2 Un effet GvL sans GvH ?

Même si la survenue d'une GvH aiguë et/ou chronique est associée à un effet GvL, un effet alloréactif anti-tumoral peut être observé en l'absence de GvH. Malgré les antigènes cibles et cellules effectrices similaires, la GvH et la GvL peuvent être partiellement dissociées au moins sur un plan clinique. Ainsi, au cours des DLI, selon la dose de LcT injectés et le délai par rapport à la greffe, on observe un risque variable de GvH sans modification de l'effet anti-leucémique^{60,61}.

On peut penser qu'en période post-greffe immédiate, l'orage cytokinique et le contexte inflammatoire amplifient la réponse allogénique globale et empêchent le discernement d'une réponse allogénique restrictive.

Il a été démontré sur des modèles murins que le transfert de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques dirigés contre un antigène mineur du receveur permettait d'obtenir une éradication des cellules leucémiques sans causer de GvH⁶². Ainsi, l'effet anti-tumoral

de l'allogreffe de CSH est une réaction complexe qui ne s'explique pas exclusivement par son interdépendance avec la GvH.

La réaction de GvL varie en fonction du donneur (critère d'histocompatibilité), du stade de la maladie, du degré de chimérisme et des traitements additionnels. De plus, selon l'hémopathie la GvL est plus ou moins corrélée à la GvH⁶³. Dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), ces deux phénomènes sont intimement liés. Pour les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), on observe une faible association des deux réactions, quant aux lymphomes et myélodysplasies la prédiction de l'effet GvL par la GvH est quasi nulle.

Les antigènes associés à la tumeur (TAA), protéines non polymorphiques surexprimées ou exprimées de façon aberrante par les cellules malignes sont également des cibles d'alloréactivité. La protéine WT1 (*Wilms' tumour 1*) est un alloantigène fortement exprimé dans la plupart des hémopathies malignes qui participe à la leucémogénèse par blocage de la différenciation. La protéinase 3 présente à l'état physiologique dans les promyélocytes normaux, est exprimée de manière aberrante dans les LMC et dans quelques LAM.

Un mécanisme de reconnaissance directe entre les cellules T et les cellules leucémiques jouant le rôle de CPA « CD-like » semble être impliqué notamment dans les LAM⁶⁴. Les lymphocytes T alloréactifs du donneur dirigés contre les mHA et les TAA vont ainsi permettre la lyse des cellules tumorales⁴⁷ (Figure 15).

Cependant, il reste difficile de mesurer l'impact de l'effet GvL sur la rechute après allogreffe sans y inclure les manifestations de GvH. Dans une étude multicentrique réalisée sur 639 allogreffes HLA identiques apparentées et 210 non apparentées, il a été démontré que l'association GvH-GvL induit un taux de rechute significativement diminué en cas de mismatch en mHA. Ainsi, l'effet des antigènes mineurs serait bénéfique seulement si on observe une réaction de GvH. En cas d'absence de GvH, il n'existerait pas d'amélioration de la survie sans rechute⁶⁵.

De ces observations découlent trente ans d'efforts scientifiques pour potentialiser l'effet GvL de cette immunothérapie tout en minimisant la réaction délétère de GvH.

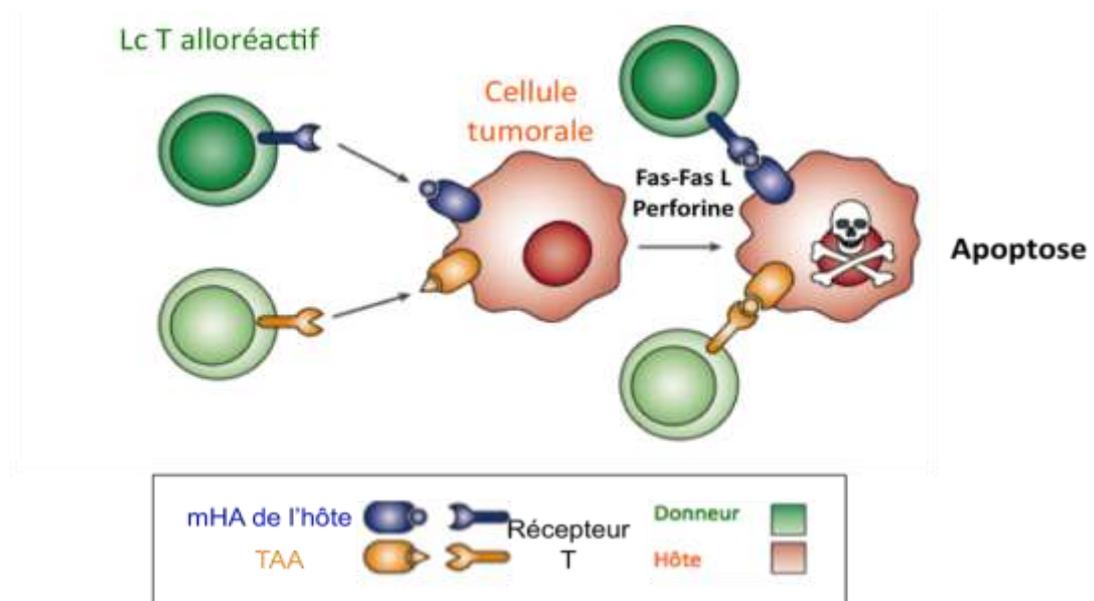


Figure 15: Mécanisme d'alloreconnaissance directe des cellules leucémiques par les lymphocytes T du donneur. D'après Van den brink et al.⁴⁷.

1.6 LES FACTEURS PRÉDICTIONNELS D'UNE GVH LORS D'UNE ALLOGREFFE HLA-IDENTIQUE

La GvH est la principale cause qui impacte sur la survie globale et la mortalité post-allogreffe de CSH HLA-identique. L'alternative pour lutter contre cette réaction délétère est d'en prédire la survenue avant les premiers signes cliniques et d'adapter l'immunosuppression en préventif afin d'éviter l'initiation du mécanisme de GvH.

De nos jours, certaines caractéristiques relatives à un couple Donneur/Receveur nous permettent de prédire le risque de survenue de GvH lors d'une greffe HLA-identique.

1.6.1 Les facteurs prédictifs de GvH liés aux caractéristiques du couple Donneur/Receveur :

Plusieurs caractéristiques relatives aux patients ont été identifiées comme augmentant le risque de GvH.

L'âge avancé du receveur va être un facteur favorisant les manifestations de GvH et particulièrement la survenue d'une GvH chronique⁶⁶. Ceci s'explique en partie par l'involution thymique naturelle ayant pour conséquences la perte de l'étape de sélection négative et donc l'émergence de clones T autoréactifs chez l'hôte^{49,67}. Une étude sur modèle murin montre que les cellules présentatrices d'antigènes de receveurs âgés ont une alloréactivité augmentée et sécrètent plus d'IL-12 et de TNF- α après stimulation⁶⁸. Une analyse réalisée sur près de 6000 allogreffes HLA-identiques conclut que l'âge du receveur est corrélé significativement à la mortalité post-transplantation. Par contre l'âge du donneur et celui du receveur ne sont pas des critères qui jouent sur la survenue d'une GvH aiguë sévère²⁵.

Classiquement, les greffes de CSH réalisées à partir d'un donneur non-apparenté présentent un risque supérieur de GVH et de rejet de greffe^{20,69}. Cependant, les résultats en termes d'efficacité et de complications post-greffe, à partir de donneurs non-apparentés 10/10, sont toutefois similaires à ceux observés à partir de donneurs familiaux pour les hémopathies malignes à risque standard⁷⁰.

Le sexe-mismatch, sous-entendant un donneur féminin pour un receveur masculin favorise une GvH aiguë par l'effet des mHA liés au chromosome Y, diminue la survie générale et augmente la mortalité post-greffe⁶⁶.

De plus, en cas de donneur féminin/receveur masculin, l'alloimmunisation de la femme par des grossesses antérieures ou par des transfusions sanguines va favoriser les manifestations de GvH⁷¹.

Les disparités en antigènes ABO entre le donneur et le receveur sont associées à une survie diminuée mais ne semblent pas avoir d'impact sur la survenue de GvH et sur le rejet post-greffe selon de larges études^{25,72}.

Les infections à CMV (Cytomégalovirus) sont des complications infectieuses majeures après l'allogreffe de CSH. Le statut CMV est un facteur à prendre en compte lors du choix du donneur car il favorise des réactivations du virus en post-greffe⁷³. Ainsi, pour un receveur séronégatif au CMV, on privilégie un donneur séronégatif. De même, un receveur séropositif sera préférentiellement greffé avec un donneur séropositif.

Une relation complexe existe entre la GvH aiguë et la réplication du CMV. Il est bien établi que lors d'une GvH aiguë le risque de survenue d'une infection à CMV est augmenté^{74,75}. Une étude montre que lors de la survenue d'une GvH aiguë de grade II à IV, le risque de réplication du CMV est augmentée de 60% en comparaison à des sujets sans GvH⁷⁶.

Toutefois, le CMV semble aussi jouer un rôle dans la survenue de la GvH, la séropositivité au CMV étant identifiée comme un facteur de risque de GvH aiguë⁷⁷. Il a été montré que les cellules endothéliales infectées par le CMV vont produire des cytokines inflammatoires comme IL-6 qui contribuent à initier la GvH aiguë⁷⁸.

Les différentes sources de greffons n'ayant pas les mêmes caractéristiques, des études prospectives randomisées ont comparé l'utilisation de moelle osseuse à celle des CSP dans des conditionnements myéloablatifs. Elles s'accordent toutes pour conclure à une reconstitution hématopoïétique plus précoce avec les CSP du fait de leur richesse plus importante en cellules immunocompétentes^{79,80}. La réaction de GvH aiguë n'est pas plus fréquente lors de greffes de CSP. Toutefois, le risque de

développer une GvH chronique semble significativement augmenté lors d'une allogreffe de CSP⁸¹ .

Concernant la greffe de sang de cordon le risque de rejet est plus élevé, la reconstitution immunitaire plus lente et les infections sont plus fréquentes.

Cependant, l'incidence de la GvH aiguë post-allogreffe de sang placentaire serait moins importante^{82,83} du fait de la réactivité diminuée des cellules T naïves aux alloantigènes (réponse abortive par apoptose précoce⁸⁴) et de l'apport d'un nombre faible de cellules T immunocompétentes .

La survenue de GvH peut être liée à la maladie initiale du receveur indiquant la greffe. Ainsi, la leucémie myéloïde chronique (LMC) prédispose à la réaction de GvH, qui est par ailleurs corrélée à la survie sans rechute^{63,70}. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont associées à une survie inférieure après allogreffe. L'état avancé de la maladie au moment de la transplantation diminue la survie globale.

Le conditionnement réalisé avant la greffe joue un rôle important sur la physiopathologie de la GvH en raison des dommages infligés aux tissus de l'hôte et particulièrement leur effet agressif sur la muqueuse gastro-intestinale. L'étude de Liu et *al.*⁸⁵ décrit un risque accru de GvH aiguë pour des patients présentant des diarrhées sévères durant le conditionnement et ceci jusqu'à 10 jours après l'allogreffe. Un conditionnement atténué permet de diminuer ces agressions tissulaires et ainsi de réduire la GvH aiguë. L'irradiation corporelle totale réalisée lors du conditionnement est également un facteur de risque qui favorise la réaction du greffon contre l'hôte.

Malgré l'harmonisation des pratiques et la prise en compte de l'ensemble de ces facteurs favorisant la GvH lors d'une allogreffe HLA-identique, nous ne sommes toujours pas capable de prédire la survenue de cette complication et sa gravité. Des études tentent de mettre en lumière d'autres paramètres afin d'anticiper la réaction du greffon contre l'hôte⁸⁶.

1.6.2 Nouvelles perspectives dans la prévention de la GvH

L'hétérogénéité de la composition des greffons s'explique par un ensemble de facteurs indépendants (âge du donneur, antécédents d'infections chroniques, source de CSH...).

Les travaux de notre équipe ont montré que le passé infectieux du donneur impacte sur la composition cellulaire du greffon. Ainsi, la séropositivité du donneur au CMV est associée à une diminution de l'expression du CD28 sur les LcT CD4⁺ et CD8⁺ et une augmentation de la sous-population CD8⁺ T_{TD}, pouvant être à l'origine du transfert d'immunité du donneur au receveur. La séropositivité à la toxoplasmose du donneur induit une augmentation des CD4⁺ T_{CM}⁸⁷. Par ailleurs, la numération des populations T CD8⁺CD28⁻ a montré son rôle prédictif du risque de rechute après allogreffe de CSH HLA-identique⁸⁸.

À la suite de l'évaluation prospective de la distribution des sous populations T naïves et mémoire dans les greffons, notre équipe a démontré l'intérêt d'évaluer la proportion de lymphocytes T CD4⁺CCR7⁺. Cette sous-population lymphocytaire exprimant le CCR7⁺ augmente significativement l'incidence et la sévérité de la GvH aiguë, sans pour autant avoir un impact sur la GvH chronique et sur la rechute.

D'autres équipes ont montré que la forte concentration en lymphocytes T régulateurs du greffon prédit une diminution de la survenue de GvH aiguë chez le receveur^{89,90}. D'ailleurs, des applications cliniques d'enrichissement *ex vivo* en Treg des greffons sont à l'essai pour prévenir la GvH⁹¹.

L'identification de facteurs génétiques prédisposant à la GvH est également au centre de nombreux travaux.

Le gène codant pour la protéine NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2*) possède différents variants se distinguant par un polymorphisme nucléotidique (SNPs : *single nucleotide polymorphism*). Certains de ces variants (SNPs 8, SNPs 12 et SNPs13) présents chez le donneur et/ou chez le receveur vont favoriser le risque de survenue de la GvH.

Les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL-6) ou anti-inflammatoires (IL-10) ainsi que le polymorphisme de leurs récepteurs peuvent influencer la survenue de GvH. Cependant, il existe encore beaucoup d'études

contradictoires sur ces sujets et ces investigations sont encore trop coûteuses et spécialisées pour être proposées en routine.

La modification de l'expression de protéines plasmatiques après l'allogreffe peut être un outil intéressant pour prédire la survenue de GvH chez les sujets greffés. Le suivi de l'expression du TNF- α est le plus fréquemment rapporté. L'augmentation de ses concentrations durant la phase de conditionnement et post-allogreffe serait prédictif d'une GvH (augmentation à J7 en faveur de GvH aiguë, augmentation durant les 3 premières semaines en faveur d'une GvH chronique)⁸⁵.

Notre équipe a travaillé sur le suivi des taux d'IL-7 et d'IL-15 (cytokines de l'homéostasie lymphocytaire) suite à l'allogreffe de CSH après conditionnement myéloablatif. Nous avons montré que l'augmentation des taux plasmatiques d'IL-7 à J14 post-greffe est significativement associée à une GvH aiguë sévère de grade II à IV. Par ailleurs, la survenue d'une rechute de la pathologie hématologique est associée à une diminution du pic d'IL-15 à J14⁹². Notre étude menée en parallèle sur les allogreffes de CSH après conditionnement atténué montre que l'augmentation des taux d'IL-7 plasmatiques est décalée dans le temps : J30 post-greffe. Des concentrations plasmatiques d'IL-7 importantes à J30 prédisent la survenue d'une GvH aiguë de grade II à IV⁹³.

L'expression de l'IL-6 et le suivi de s-BAFF (facteur soluble d'activation des cellules B) sont également des marqueurs potentiels de GvH actuellement étudiés par d'autres équipes.

Enfin, différents biomarqueurs sont évalués dans le but de prédire la GvH⁸⁶:

- IL2R α (Récepteur à l'IL-2 α)
- TNFR-1 (*Tumor necrosis factor receptor-1*)
- HGF (*Hepatocyte growth factor*)
- IL-8 : chimiokine permettant le recrutement des polynucléaires sur les sites d'infection.
- Élafine : protéase présente dans la peau avec des propriétés anti-microbiennes. C'est un biomarqueur intéressant de GvH car son expression permet

de distinguer les symptômes cutanés liés à la GvH des autres causes de rash (cause d'origine médicamenteuse par exemple).

- REG3 α : protéine anti-bactérienne sécrétée par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin. Le suivi de REG3 α permettrait de discriminer les manifestations digestives dues à la GvH des autres causes (infectieuse, toxicité du conditionnement).

Ce panel de biomarqueurs évalué à J0, J7, J14 et J28 post-allogreffe permet de prédire la survenue de GvH (séparation des patients en 2 groupes : risque élevé ou risque faible de GvH), sa sévérité mais également la réponse clinique aux traitements curatifs⁹⁴.

Devant l'ensemble de ces observations, la communauté scientifique suggère la création d'un algorithme évaluant les risques de GvH pour chaque allogreffé basé sur :

- les facteurs cliniques (âge, les caractéristiques du couple donneur/receveur, le conditionnement, la pathologie sous-jacente)
- le greffon et sa composition
- les facteurs de risques génétiques (polymorphisme à l'IL-10, NOD2...)
- le suivi d'expression de protéines plasmatiques (TNF- α , IL-7)
- les biomarqueurs de GvH.

Cependant, ceci reste difficile à réaliser devant la diversité des paramètres influant sur la réaction de GvH. Devant ce constat il est malaisé pour les cliniciens d'anticiper la survenue de complications post-allogreffe (GvH, infections, rejet de greffe, rechute de la maladie), d'où l'intérêt d'élaborer un modèle *in vitro* permettant d'évaluer pour chaque patient l'alloréactivité des lymphocytes T du donneur et de prédire la survenue d'une GvH et/ou de la rechute *in vivo*.

2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les lymphocytes T apportés par un greffon de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont un rôle déterminant dans l'effet anti-leucémique mais sont également principalement responsables de l'effet néfaste de GvH.

Devant l'absence d'outils biologiques permettant de prédire la survenue d'une GvH aiguë et sa gravité, on se propose de développer des tests *in vitro* capables de modéliser et de quantifier les réponses allogéniques des cellules T du greffon vis-à-vis d'un receveur.

Ce projet est mené en collaboration avec le Service des Maladies du Sang du CHRU de Lille et le laboratoire HLA-Transplantation de l'Institut d'Immunologie. Il a pour objectif à terme d'être inclus dans une étude prospective lors d'allogreffes de CSP HLA-identiques. La réalisation des tests au moment de la greffe et le suivi clinico-biologique des receveurs permettront d'évaluer la valeur prédictive de cette approche pour la survenue d'une GvH aiguë, sa gravité et/ou de la rechute.

L'objectif de mon travail de thèse est le développement de ces tests biologiques, première étape indispensable avant d'envisager toute étude prospective. Notre approche est réalisée sur des adultes volontaires sains HLA-incompatibles et des paires HLA-compatibles. Les réponses allogéniques sont basées sur un modèle de culture mixte lymphocytaire sensibilisée (MLDCR) uni-directionnelle. Les lymphocytes T sont stimulés par des cellules dendritiques matures, préalablement dérivées de monocytes sanguins. L'évaluation fonctionnelle de l'alloréactivité lymphocytaire est basée sur la quantification de la production d'IFN- γ en situation allogénique.

Notre première étape est d'obtenir une réponse allogénique spécifique, franche en cas d'incompatibilités en antigènes majeurs pour s'assurer de la pertinence de notre modèle.

Secondairement, ce protocole est testé en condition HLA-identique pour évaluer la sensibilité de notre approche lors du seul effet allogénique des antigènes mineurs sur l'alloréactivité des lymphocytes T.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre approche expérimentale est fondée sur une réaction lymphocytaire mixte sensibilisée (MLDCR) d'une durée de 12 jours. En effet, la faible réponse attendue aux antigènes mineurs en situation HLA-identique nous incite à opter pour un modèle de culture prolongée et deux étapes d'alloimmunisation. À terme, notre test doit permettre d'analyser l'alloréactivité des cellules T du greffon (cellules répondeuses) en co-culture avec des cellules dendritiques matures du receveur (cellules stimulantes) lors de greffes HLA-identiques.

3.1 ÉTUDE DE LA VIABILITÉ DES LYMPHOCYTES T EN CULTURE PROLONGÉE

La maîtrise et la standardisation des conditions de culture sont indispensables à l'application ultérieure de notre test. Nous devons ainsi nous assurer de conserver une viabilité lymphocytaire suffisante lors d'une culture de 12 jours en utilisant avec parcimonie des cytokines pour ne pas engendrer une prolifération non spécifique génératrice d'un bruit de fond élevé.

C'est pourquoi, nous avons étudié l'influence de l'ajout de cytokines participant à l'homéostasie lymphocytaire (IL-2,IL-7) sur des prélèvements de sang périphérique mais aussi des échantillons de CSP, afin d'évaluer l'effet sur la viabilité des lymphocytes T et la prolifération cellulaire après 12 jours de culture.

3.1.1 Recueil des prélèvements

3.1.1.1 *Prélèvement de sang périphérique de sujets sains*

Quatre sujets volontaires sains pour lesquels nous avons obtenus un consentement éclairé ont été prélevés sur tubes héparinés (10mL).

L'isolement des cellules mononucléées (CMN) est obtenu par centrifugation sur gradient de Ficoll (Ficoll Paque, GE, Uppsala, Suède) du sang dilué au demi dans de l'eau physiologique apyrogène stérile. L'anneau de CMN ainsi recueilli est lavé à deux reprises dans de l'eau physiologique.

3.1.1.2 *Prélèvement de cellules souches périphériques*

Quatre CSP ont été étudiées pour l'évaluation de la viabilité des lymphocytes T en culture prolongée. Les échantillons d'approximativement 800µl sont issus de la

poche du greffon préparée pour le receveur et sont récupérés le jour de la greffe. Ils ont été réceptionnés au laboratoire et traités délibérément après des délais variables d'acheminement pour tester la robustesse de notre modèle. L'isolement des CMN ayant été effectué lors du recueil par cytophérèse, un simple lavage des cellules est réalisé en tampon phosphate stérile (PBS, 150mM, pH=7,4, Sigma, St Louis, USA). L'ajout de 50 µl d'une solution de désoxiribonucléase I ou ADNase I à la concentration de 50mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) est effectué en prévention de la formation d'agrégats du fait des fortes concentrations cellulaires de l'échantillon et des traitements préalables subis par les CSP avant injection. Avec cette précaution, aucun problème lié à l'agrégation des cellules n'a été rencontré.

3.1.2 Culture cellulaire

3.1.2.1 Isolement des lymphocytes T par tri cellulaire magnétique des échantillons

L'isolement des lymphocytes T à partir des CMN est réalisé par une technique de tri négatif grâce à un coffret commercialisé (EasySep® Human T Enrichment Kit, StemCell Technologies). Des complexes d'anticorps tétramériques reconnaissant les antigènes CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b, CD123 et la glycophorine A sont ajoutés à la suspension de CMN. Ces tétramères d'anticorps se fixent à leurs cibles spécifiques exprimées à la surface des cellules. Secondairement, les complexes anticorps/cellules vont grâce à l'anticorps anti-dextran s'associer à des billes magnétiques. Enfin, le tube est placé dans un aimant EasySep™ où les cellules marquées sont retenues contre les parois du tube grâce au champ magnétique (Figure 16). Les lymphocytes T CD3⁺ restent ainsi en suspension dans le surnageant.

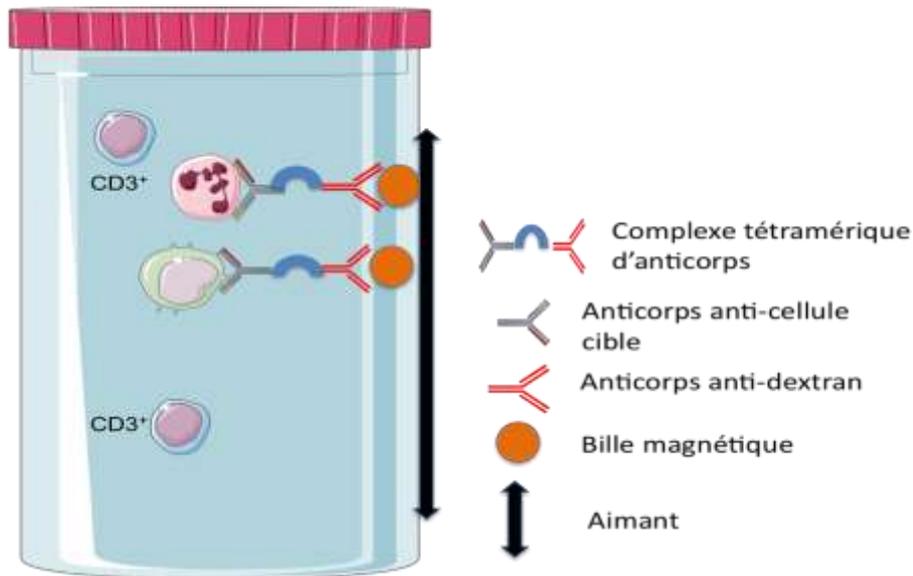


Figure 16 : Principe schématisé du tri de lymphocytes T par sélection magnétique négative (Coffret EasySep® Human T Enrichment Kit, StemCell Technologies).

3.1.2.2 Contrôle de la viabilité des lymphocytes T post-tri, mis en culture à J0

Afin de s'assurer de la bonne viabilité des lymphocytes T isolés par tri magnétique, on réalise un immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux (Navios, Beckman Coulter, France). L'ajout de billes (Flow count™ Fluorospheres, Beckman Coulter) à un échantillon de cellules triées permet la numération des lymphocytes T viables. Le phénotypage nous assure de la pureté en lymphocytes T CD3⁺ post-tri par marquage des cellules avec des anticorps monoclonaux : CD45 PC7 (Beckman Coulter), CD3 PE (Beckman Coulter), CD4 FITC (BD Biosciences, USA) et CD8 APC (Beckman Coulter)

3.1.2.3 Conditions de culture

La culture de lymphocytes T se réalise dans des plaques stériles de 96 puits à fond plat (Thermo scientific, Danemark) dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Oslo, Norvège) supplémenté à 10% (volume pour volume) en sérum humain AB décomplémenté (Institut J.Boy, France), en L-Glutamine (2mM, Eurobio, France) , en pyruvate (2mM, PAA, USA), en pénicilline G (100UI/mL, Gibco), en streptomycine (100µg/mL, Gibco) et en gentamicine (40mg/mL, Panpharma).

Quatre conditions de culture ont été testées en parallèle pour déterminer la plus adaptée afin de préserver la viabilité lymphocytaire sans induire d'activation et de prolifération:

- LcT : sans ajout de cytokines (culture témoin)
- LcT+IL-2 : ajout d'IL-2 à la concentration de 10UI/mL (Roche Diagnostics, Allemagne) à J3 et J7
- LcT+IL-7 : ajout d'IL-7 à la concentration de 50pg/mL (R&D Systems, USA) à J0, J3, J7 et J10
- LcT+IL-2+IL-7 : ajout d'IL-2 à la concentration de 10UI/mL à J3 et J7 et ajout d'IL-7 à la concentration de 50pg/mL à J0, J3, J7 et J10

L'ensemble de ces conditions est testé sur les 4 prélèvements issus de CSP (CSP1 à 4) et sur les 4 prélèvements issus de sujets sains (CMN1 à 4)

Une quantité de $2 \cdot 10^5$ lymphocytes T CD3⁺ est mise initialement (J0) dans un puits avec un volume final de 200µl. Le milieu est changé de moitié tous les 3 à 4 jours, la durée de culture étant de 12 jours à 37°C sous 5% de CO₂.

3.1.2.4 Suivi de culture

Un suivi microscopique de la culture est réalisé tous les 3 à 4 jours pour s'assurer de la stérilité du milieu (recherche d'éventuelles contaminations d'origine bactérienne ou fongique) et observer l'évolution morphologique des cellules. Les lymphocytes T en culture ont une morphologie homogène et sphérique.

On réalise à J0, J7 et J12 un immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux (Navios, Beckman Coulter) qui permet un suivi de la numération par ajout de billes (Flow countTM Fluorospheres, Beckman Coulter) et un phénotypage grâce au marquage par des anticorps monoclonaux CD45 PC7 (Beckman Coulter), CD3 PE (Beckman Coulter), CD4 FITC (BD Biosciences) et CD8 APC (Beckman Coulter).

3.2 LES RÉACTIONS LYMPHOCYTAIRES MIXTES SENSIBILISÉES

3.2.1 Sujets

Pour la mise au point de notre modèle, nous avons choisi de travailler avec des prélèvements de sang périphérique issus de sujets adultes volontaires sains après consentement. Cette approche est pertinente car les travaux antérieurs de notre équipe, ont montré que les proportions en lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ naïfs et mémoires dans le sang total sont similaires à celles retrouvées dans les greffons⁸⁷.

- Paires de sujets HLA incompatibles : Sujet 1 à 4

Étant donné la difficulté de recrutement de sujets volontaires sains HLA-identiques, nous nous sommes placés initialement en condition d'incompatibilité en antigènes majeurs. Les cellules stimulantes (cellules dendritiques dérivées de monocytes) ou répondeuses (cellules T) proviennent de prélèvements héparinés (30 mL) de quatre sujets non apparentés.

- Paires de sujets HLA-identiques: Paire A à D

Quatre paires de sujets sains HLA identiques issues de fratries ont participé à l'étude (Tableau 4).

L'identité HLA entre les couples est recherchée par un typage HLA en sérologie pour la classe I et en biologie moléculaire pour la classe II. Pour les antigènes HLA de classe II, le typage au niveau allélique a été réalisé par PCR-RSSO (Polymerase Chain Reaction with Reverse Sequence Specific Oligonucleotides) pour HLA-DRB1* et PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers) pour HLA-DQB1*.

Paire issue de la même fratrie	Sujet	Sexe	Typage HLA
Paire A	A1	Féminin	A03;24 B07;08 Cw07 DRB1*15:01 DRB1*03:01 DQB1*06:02 DQB1*02:01
	A2	Masculin	
Paire B	B1	Féminin	A24;29 B44;60 DRB1*01:01 DRB1*14 :54 DQB1*05 :01 DQB1*05 :03
	B2	Féminin	
Paire C	C1	Masculin	A02;25 B39;50 DRB1*03 :01 DRB1*16 :01 DQB1*02 :01 DQB1*05 :01
	C2	Masculin	
Paire D	D1	Féminin	A01;30 B44;57 Cw06 Cw16 DRB1*15:01 DRB1*07:01 DQB1*06:02 DQB1*02:02
	D2	Masculin	

Tableau 4 : Caractéristiques des couples HLA-identiques étudiés.

L'existence d'un sexe-mismatch pour les couples A et D assure une incompatibilité en antigène mineur H-Y. À l'inverse, la paire B exclut le rôle de H-Y dans l'alloréactivité lymphocytaire.

3.2.2 Culture cellulaire

3.2.2.1 Différenciation de cellules dendritiques matures à partir de monocytes circulants

L'isolement des monocytes à partir des CMN est effectué par une technique de tri négatif avec billes magnétiques (EasySep® Monocyte Enrichment Kit, StemCell Technologies) à 4°C. L'ajout de complexes d'anticorps tétramériques reconnaissant les antigènes CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 et la glycophorine A permettent un marquage de l'ensemble des populations cellulaires à l'exception des monocytes. Les cellules marquées sont ensuite incubées avec des billes magnétiques recouvertes d'Ac anti-dextran. Après exposition de la suspension à un aimant, le surnageant enrichi en monocytes est récupéré et lavé.

Les monocytes sont ensuite cultivés dans des plaques 24 puits (Costar, Corning, USA) à la concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules dans 1 mL de milieu GMP *serum-free dendritic cell medium*: Cellgro® (Cellgenix, Freiburg, Allemagne) supplémenté en pénicilline G (100UI/mL, Gibco), streptomycine (100µg/mL, Gibco) et gentamicine (40mg/mL, Panpharma).

Il existe plusieurs techniques de différenciation des monocytes circulants en cellules dendritiques⁹⁵. Notre choix de protocole s'appuie sur l'étude de Lee et *al.*⁹⁶ qui montre que les cellules dendritiques matures obtenues avec ce processus de différenciation engendrent une meilleure stimulation des lymphocytes en réaction lymphocytaire mixte sensibilisée par des cellules dendritiques (MLDCR).

Les deux cytokines utilisées pour le processus de différenciation des monocytes en cellules dendritiques⁹⁶ sont:

- GM-CSF à 25 ng/mL (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne)
- IL-4 à 15 ng/mL (Miltenyi Biotec)

À J3, le milieu est renouvelé en rajoutant 1mL de GMP avec de l'IL-4 et du GM-CSF.

À J5, la maturation des cellules dendritiques est déclenchée par l'ajout de molécules pro-inflammatoires au milieu de culture:

- TNF- α à 10ng/mL (Miltenyi Biotec)
- IL-1 β à 10ng/mL (Miltenyi Biotec)
- IL-6 à 10ng/mL (Miltenyi Biotec)
- Prostaglandine E₂ (PGE₂) à 1 μ g/mL (Sigma-Aldrich)

Après 2 jours de culture dédiés à l'étape de maturation (J7), nous obtenons des cellules dendritiques matures.

La validation des étapes de dérivation et de maturation des monocytes en cellules dendritiques matures est basée sur l'analyse par cytométrie en flux (Navios, Beckman Coulter) du degré d'expression membranaire de plusieurs molécules à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués (Figure 17):

- CD14 FITC (Beckman Coulter) : marqueur présent sur les monocytes
- HLA-DR PE (BD Biosciences) ; CD80 PE (BD Biosciences) : marqueurs exprimés sur les CD immatures et matures
- CD83 PE (BD Biosciences) : marqueur présent à la surface des CD matures
- Contrôle isotypique: Ig1 Mouse-FITC et Ig1 Mouse-PE (Beckman Coulter)

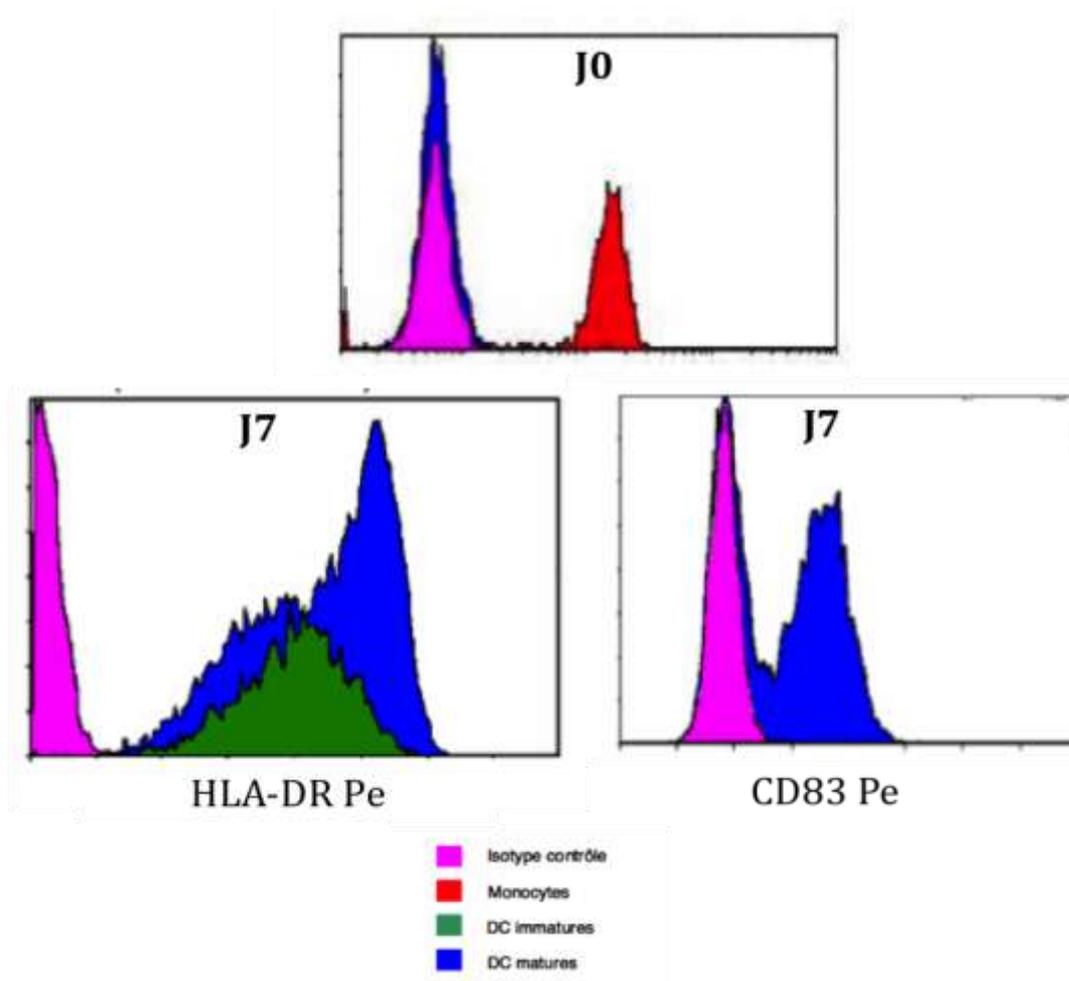


Figure 17 : Histogrammes monoparamétriques illustrant à différents temps de culture la maturation des cellules dendritiques obtenues par différenciation de monocytes sanguins périphériques (exemple représentatif).

3.2.2.2 Protocole de congélation de cellules

La congélation des cellules est une étape importante pour la mise en place de notre test. En effet, la restimulation par des cellules dendritiques matures à J7 de la MLDCR et à J11 pour la réalisation du test d'Elispot nous impose de réaliser plusieurs cultures de CD, d'où la congélation initiale de cellules pour éviter la répétition des prélèvements des sujets.

Plusieurs stratégies ont été testées pour améliorer la génération de CD à partir de prélèvements congelés.

La congélation d'aliquotes de $5 \cdot 10^6$ monocytes après leur tri dans 500 μ l de sérum de veau foetal (Gibco) avec 10% de DMSO (Gibco) nous donne de bons résultats à la

décongélation (70 à 90% des monocytes congelés sont viables après décongélation). Cependant après 7 jours de culture, seul 10% des monocytes se différencient en cellules dendritiques matures.

La deuxième approche testée est la congélation de CMN après ficoll réalisée dans un 1 mL de milieu DMEM+ 10% DMSO (Gibco) pour 10 millions de CMN. Dans ces conditions, on ne récupère que 50% à 60% de monocytes après décongélation. En revanche, 85% à 100% des monocytes triés des CMN se différencient en cellules dendritiques.

Devant ces résultats, la congélation de CMN dans le milieu DMEM+10% DMSO est le protocole le plus pertinent pour notre modèle d'étude de l'alloréactivité.

3.2.2.3 Principes de culture de la réaction lymphocytaire mixte sensibilisée par des cellules dendritiques

Notre protocole de MLDCR s'appuie sur 12 jours de co-culture dans une étuve à 37°C sous 5% de CO₂.

La culture est réalisée dans des plaques 96 puits à fond plat (Thermo scientific,) en milieu RPMI supplémenté (décrit au préalable) avec un volume final de 200µl. Le ratio cellules stimulantes/cellules répondeuses est de 1 pour 20 ($2 \cdot 10^5$ LcT pour $1 \cdot 10^4$ CD). En situation HLA-incompatible, on ajoute à J3 et à J7 de l'IL-2 à 10UI/mL (Roche Diagnostics). Pour les co-cultures avec les paires HLA-identiques, en plus de l'IL-2 à J3 et J7, on ajoute de l'IL-7 à 50pg/mL (R&D Systems) à J0, J3, J7 et J10.

Le milieu est changé pour moitié tous les 3 à 4 jours. Une restimulation par des cellules dendritiques matures est réalisée à J7.

Pour chaque MLDCR, trois conditions de co-culture sont menées en parallèle :

- Puits en condition autologue : Les LcT sont stimulés par des CD autologues.
- Puits en condition allogénique : Les LcT sont stimulés avec des CD allogéniques.
- Puits de lymphocytes T cultivés seuls permettant d'évaluer la viabilité lymphocytaire au cours de la culture.

Le suivi de la culture de fait par microscopie optique tous les 3 jours pour surveiller l'apparition de foyers de prolifération (Figure 18).

On réalise un suivi de la numération lymphocytaire pour diviser les puits lors d'une prolifération importante (> 500000 cellules/puits) afin d'éviter la confluence des puits.

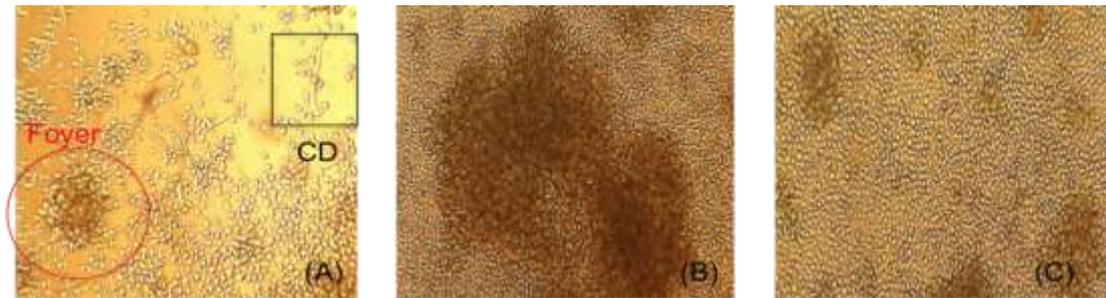


Figure 18 : Observation microscopique de la réaction de MLDCR, culture représentative (Grossissement x125).

(A) Puits en condition allogénique à J3. **(B)** Puits en condition allogénique à J7 avec foyers de prolifération importants. **(C)** Puits en condition autologue à J7 avec formation de petits foyers de prolifération.

3.3 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE PAR ÉVALUATION DES CAPACITÉS FONCTIONNELLES DES LYMPHOCYTES T

L'évaluation de la réponse alloréactive des lymphocytes T étudiés repose sur la production d'IFN- γ évalué par ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) à J11 de la co-culture.

Nous avons transféré les cellules dans les puits des plaques de T-SPOT TB® recouverts d'anticorps anti-IFN- γ (Oxford Immunotec, Oxfordshire, UK). Une numération cellulaire a été réalisée dans le but d'ajuster le nombre de cellules à 1×10^6 LcT par puits. Pour évaluer une production d'IFN- γ spécifique à un contact antigénique, on réexpose les lymphocytes T aux cellules dendritiques matures (50000 CD par puits) pendant 20 heures de culture à 37°C sous 5% de CO₂ dans un milieu AIMV (Gibco).

L'évaluation de la production cellulaire d'IFN- γ se fait par l'ajout d'un Ac murin anti-IFN- γ couplé à la phosphatase alcaline. La révélation du test se fait par addition d'un substrat prêt à l'emploi: BCIP/NBTplus.

La lecture des spots est effectuée au scanner (Immunoscan, Cellular Technology Ltd Europe GmbH), après une nuit de séchage à température ambiante et à l'obscurité. Le décompte des spots par puits s'effectue grâce au logiciel TB Scan (Cellular Technology Ltd Europe GmbH).

La réponse aux antigènes majeurs (MHA) pour les sujets HLA incompatibles 1 à 4 est explorée en ELISPOT par les conditions suivantes :

* Culture Témoin Autologue (Figure 19.A) :

- Puits [Stim Auto/ Exp Auto] : LcT stimulés en condition autologue pendant 11 jours et exposés aux CD autologues lors des 20h du test en ELISPOT.
- Puits [Stim Auto/ Expo=Allo MHA] : LcT stimulés en condition autologue pendant 11 jours et exposés aux CD allogéniques MHA lors de l'ELISPOT.
- Puits [Stim Auto/ Sans Exp] : LcT stimulés en condition autologue sans exposition aux CD lors de l'ELISPOT. Puits dont la valeur est soustraite aux autres puits de la culture autologue.

* Culture Allogénique (Figure 19.B) :

- Puits [Stim Allo MHA/ Expo=Auto] : LcT stimulés en condition allogénique MHA pendant 11 jours et exposés aux CD autologues lors des 20h du test en ELISPOT.
- Puits [Stim Allo MHA/ Expo=Allo MHA] : LcT stimulés en condition allogénique MHA pendant 11 jours et exposés aux CD allogéniques MHA lors de l'ELISPOT.
- Puits [Stim Allo MHA/ Expo=0] : LcT stimulés en condition allogénique MHA sans exposition aux CD lors de l'ELISPOT. Puits dont la valeur est soustraite aux autres puits de la culture allogénique.

Les mêmes conditions seront explorées pour les couples HLA compatibles (Couple A à D). Ces 8 cultures vont nous permettre de modéliser l'effet des antigènes mineurs (mHA) sur la sécrétion d'INF- γ par les LcT.

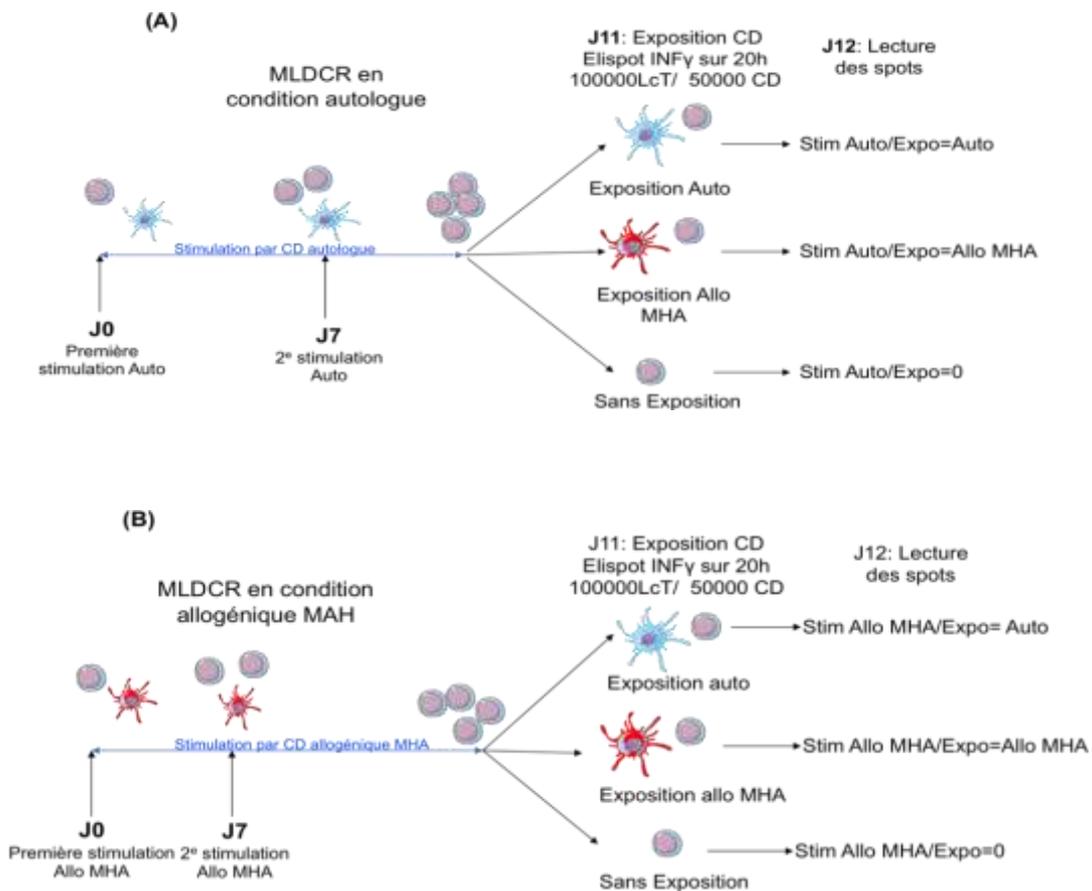


Figure 19: Représentation de l'ensemble du protocole d'étude de l'alloréactivité lymphocytaire en situation HLA-incompatible.

(A) Étude de la culture autologue. **(B)** Étude de la culture allogénique en antigènes majeurs (MHA)

3.4 ANALYSE STATISTIQUE

Les numérations des lymphocytes T viables en fonction des conditions de culture (3.1) ont été comparées par un test ANOVA associé à une analyse de comparaisons multiples selon Tuckey.

Le test statistique de comparaison de moyennes de Mann et Whitney (*U*-test) a été utilisé pour l'analyse de nos échantillons non paramétriques non appariés. Lorsque nos données étaient issues d'échantillons non paramétriques appariés, nous avons utilisé le test de comparaison des moyennes de Wilcoxon.

Une différence est considérée comme statistiquement significative pour un $p < 0,05$ avec un risque de 5%.

Les représentations graphiques ont été réalisées sur le logiciel Excel 12 (Microsoft, Redmond, SA) et sur Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla USA).

4 RÉSULTATS

4.1 ÉTUDE DE LA VIABILITÉ LYMPHOCYTAIRE EN CONDITIONS BASALES DE CULTURE

4.1.1 Mortalité des lymphocytes T lors d'une culture prolongée en conditions basales

Notre modèle de stimulation antigénique nécessitant une culture prolongée, on se propose d'évaluer dans un premier temps la viabilité de lymphocytes T au décours d'une culture en conditions basales pendant 12 jours. Cette étude préalable est menée sur 4 CSP et 4 prélèvements de CMN issus de sang total. Le suivi de la numération lymphocytaire est réalisé par cytométrie en flux qui permet par l'étude du cytogramme de distinguer les proportions relatives de cellules viables, altérées et les débris cellulaires.

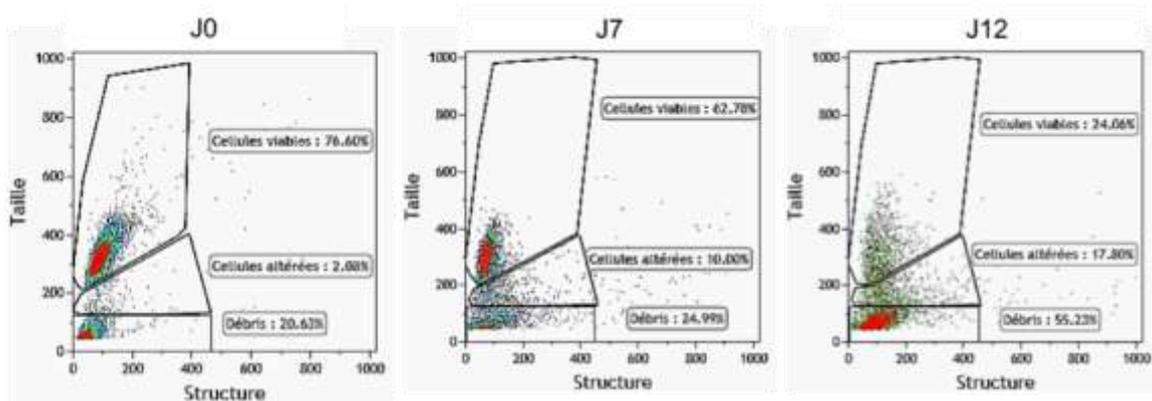


Figure 20 : Suivi de la viabilité des lymphocytes T en conditions basales de culture par cytométrie en flux. Exemple représentatif de cytogrammes obtenus lors de la culture de 200.000 LcT sans ajout de cytokines. Les proportions relatives de cellules viables, cellules altérées et débris sont déterminées par des fenêtres d'intérêt positionnées de façon standardisée au niveau du cytogramme.

L'analyse des cytogrammes témoigne de la mortalité importante des lymphocytes T cultivés sans ajout de cytokines. La proportion de cellules viables décline progressivement au cours de la culture. À J12, on observe une prédominance de débris et de cellules altérées, le nuage de lymphocytes T viables étant inexistant.

Le nombre des lymphocytes T viables diminue de manière sensible au fil des jours de culture pour l'ensemble des prélèvements qu'il s'agisse de cellules T du sang périphérique ou de CSP. À J7, les numérations médianes montrent la perte de la moitié des lymphocytes T mis en culture (119.043 LcT, soit une viabilité médiane de 59,5% des LcT initiaux). À J12, moins d'un quart des cellules T conservent les caractéristiques de taille et de structure de cellules viables (39.381 LcT, soit une viabilité médiane de 19,7% des LcT initiaux). Les valeurs extrêmement basses pour la CSP3 s'expliquent par un délai d'acheminement important estimé à 12h après injection de la poche au patient (Figure 21).

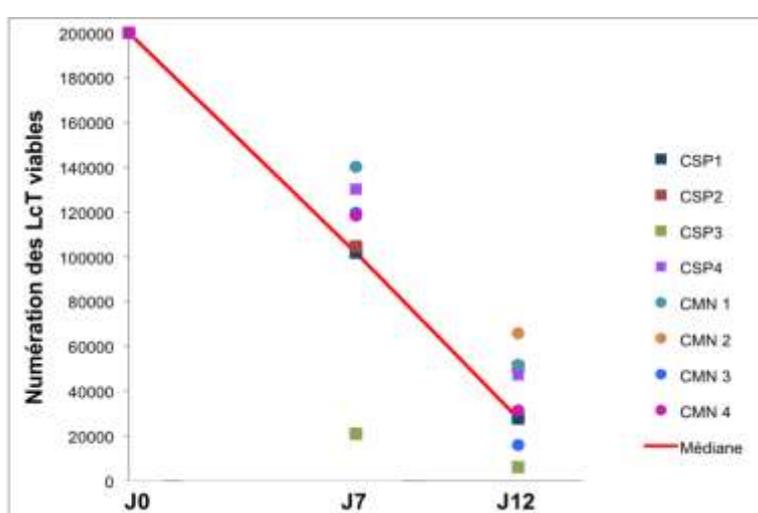


Figure 21 : Suivi de la numération des LcT viables cultivés sans ajout de cytokines pendant 12 jours. Étude réalisée sur 4 CSP et 4 prélèvements de CMN.

La survie des LcT isolés à partir de CSP est comparable à celle des LcT sanguins ; les numérations à J12 des LcT cultivés isolément ne sont pas significativement différentes ($p=0,77$).

4.1.2 Devenir de la viabilité lymphocytaire sous l'effet de cytokines

Le maintien prolongé de la survie des lymphocytes T nous est indispensable pour optimiser notre protocole, programmé sur 12 jours de culture. Au vu de la mortalité des lymphocytes en conditions basales de culture, nous avons opté pour l'ajout de cytokines et testé des concentrations faibles d'IL-2 (10UI/mL à J3 et J7) et/ou d'IL-7 (50pg/mL à J0, J3, J7 et J10) en nous basant sur l'expérience du laboratoire.

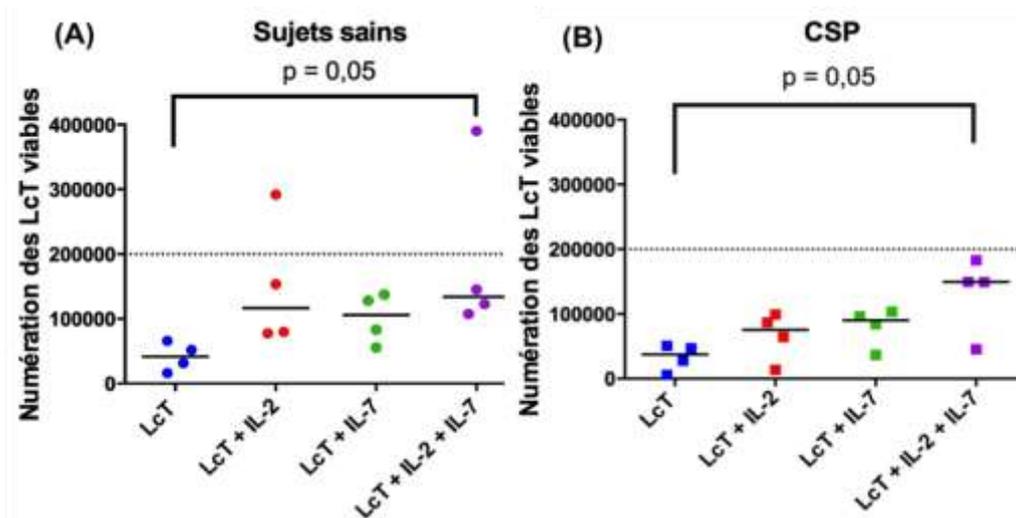


Figure 22 : Numération des LcT viables cultivés pendant 12 jours avec ou sans ajout de cytokines au milieu de culture. **(A)** Étude menée sur 4 prélèvements issus de CMN de sujets sains. **(B)** Étude menée sur 4 prélèvements issus de CSP. La ligne hachurée symbolise le nombre de lymphocytes mis en culture à J0. Les traits horizontaux continus représentent les valeurs médianes des cellules T viables à J12.

Selon le test statistique de l'ANOVA, seule la condition LcT+IL-2+IL-7 se différencie des autres conditions aussi bien pour les CMN que pour les CSP. De plus, le test de comparaisons multiples de Tuckey montre qu'il existe une différence significativement supérieure ($p=0,05$) entre la moyenne des numérations des LcT isolés et celle des LcT cultivés avec de l'IL-2 et de l'IL-7 pour les CSP et les CMN.

On note que l'ajout d'IL-2 engendre pour l'un des sujets une prolifération lymphocytaire à J12 (Figure 22.A). Cependant, les médianes des numérations pour l'ensemble des prélèvements étudiés restent en dessous de la quantité initiale de LcT à J0.

La comparaison des numérations lymphocytaires lors d'ajout d'IL-2 et d'IL-7 ne dégage pas de différence significative selon le test de Mann et Whitney ($p=0,82$) entre les deux types de prélèvements

Ainsi, lors d'addition d'IL-2 et d'IL-7, la viabilité des LcT issus de CSP est comparable à celle observée pour les CMN.

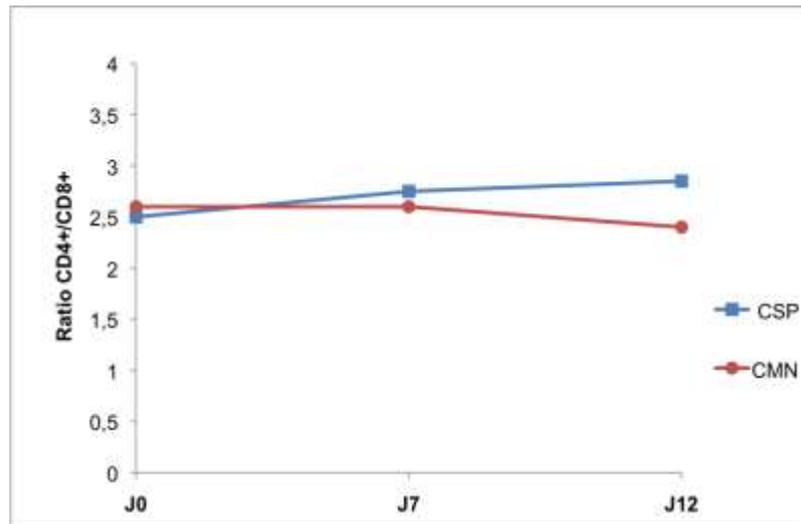


Figure 23 : Évolution du ratio CD4+/CD8+ au cours de la culture de LcT supplémentée en IL-2 et IL-7. Représentation des valeurs médianes pour les 4 CSP étudiées et les 4 prélèvements issus de CMN de sujets sains.

Nous avons vérifié le respect global des proportions des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ lors de l'ajout d'IL-2 et d'IL-7. La comparaison statistique par le test de Wilcoxon entre les ratios à J0 et J12 montre une différence non significative pour les CSP ($p=0,75$) ainsi que pour les CMN ($p=0,50$).

En conclusion, l'ajout d'IL-2 et d'IL-7 lors d'une culture prolongée semble être indispensable. Cela nous permet de conserver une viabilité lymphocytaire acceptable (viabilité médiane de 73,6% des LcT initiaux) sans induire de prolifération ni modifier la répartition des populations lymphocytaires T majeures.

4.2 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE DES LYMPHOCYTES T EN SITUATION D'INCOMPATIBILITÉ EN ANTIGÈNES MAJEURS

4.2.1 Suivi des numérations lymphocytaires au cours de la culture

Pour la mise au point de notre test, notre protocole a été élaboré dans un premier temps sur des sujets HLA-incompatibles, l'alloréactivité dirigée contre les antigènes majeurs d'histocompatibilité étant plus importante et plus aisée à détecter. Pour l'ensemble de ces cultures, seule l'IL-2 a été ajoutée aux conditions basales de culture.

Après 11 jours de culture, 52% des lymphocytes T cultivés **isolément** sont considérés comme viables (médiane des numérations : 103.500 LcT). Sur le cytogramme, les cellules viables ont la taille/structure de LcT quiescents.

Après culture prolongée avec des CD matures autologues ou allogéniques les lymphocytes T prolifèrent. Les cytogrammes montrent une augmentation de la taille et de la structure des lymphocytes T illustrant leur activation et prolifération. Celle-ci varie selon les sujets, et de manière attendue, est toujours nettement supérieure en condition d'incompatibilité en antigènes majeurs. La médiane des numérations en condition allogénique est de 2.240.590, celle de la culture autologue étant de 930.000. Toutefois, en raison du faible nombre de cultures, ces valeurs ne sont pas significativement différentes selon le test de Wilcoxon ($p=0,068$).

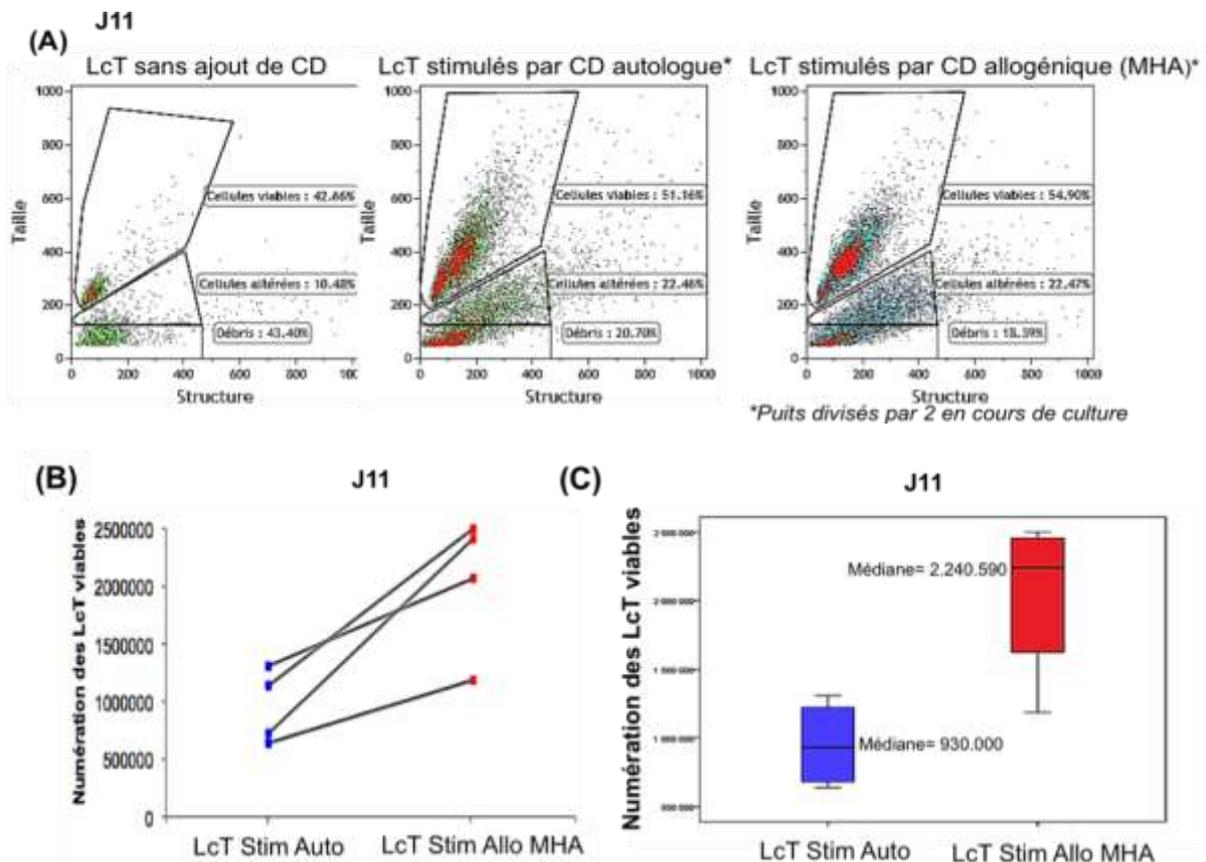


Figure 24 : Numération lymphocytaires à J11 pour les cultures des sujets 1 à 4.

(A) Exemple représentatif de cytogrammes obtenus à J11 pour les cultures de LcT sans ajout de CD, pour les cultures autologues et allogéniques (MHA). Les puits ont été divisés par 2 pour les conditions autologues et allogéniques. **(B)** Numération en valeurs absolues des lymphocytes T stimulés par des CD autologues ou allogéniques (MHA) pour les 4 cultures réalisées en mismatch. **(C)** Représentation de la médiane des numérations lymphocytaires à J11 pour les deux cultures avec stimulation par des cellules dendritiques.

4.2.2 Approche fonctionnelle par analyse de la sécrétion d'IFN- γ

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que la mesure d'une réponse lymphoproliférative par thymidine tritiée n'est pas une méthode suffisamment sensible en situation d'alloréactivité aux antigènes mineurs. De ce fait, nous avons d'emblée privilégié une évaluation fonctionnelle de la réponse autoréactive et alloréactive basée sur l'analyse de la production d'IFN- γ par ELISPOT.

Pour ce faire, au terme de la co-culture, les cellules stimulées par des CD autologues ou allogéniques sont recueillies et exposées pendant 20 heures au stimulus initial ou à un autre stimulus pour quantifier la production spécifique d'IFN- γ .

4.2.2.1 Analyse de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T stimulés par des cellules dendritiques autologues

En raison de la prolifération lymphocytaire observée après culture prolongée **en condition autologue**, nous avons quantifié la production d'IFN- γ lors d'une exposition finale de ces cellules à des cellules dendritiques autologues, allogéniques ou sans cellule dendritique. Cette quantification nous permet d'étudier la production d'IFN- γ liée à l'autoréactivité.

Nos résultats mettent en évidence une production d'IFN- γ en ELISPOT que l'on peut qualifier de « spontanée » lorsque les LcT cultivés en condition autologue pendant 11 jours avec de l'IL-2 ne sont pas réexposés à leur stimulus initial : condition [Stim Auto/Expo=0]. Cette production spontanée est systématiquement soustraite aux autres conditions d'ELISPOT où il existe une exposition finale à des cellules dendritiques. Dans le cas d'une culture prolongée avec addition d'IL-2 seule, cette valeur est restée infime (maximum 10 spots, médiane à 0)

Après stimulation prolongée par des CD autologues et leur exposition finale brève à ce même stimulus autologue [Stim Auto/Expo=Auto], nous observons une production d'IFN- γ avec un nombre médian de spots à 188 pour les 4 cultures. Cette valeur reflète la sécrétion d'IFN- γ induite par l'activation et la différenciation *in vitro* de lymphocytes T autoréactifs. La sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T autoréactifs n'est pas significativement différente ($p=0,25$) de celle mesurée lorsque les

lymphocytes T sont exposés finalement à des cellules dendritiques allogéniques : nombre médian de spots=99 pour les puits [Stim Auto/Expo=AlloMHA] (Figure 25.B).

L'ensemble de ces résultats obtenus en situation autologue nous montre que l'exposition finale brève de cellules T à un stimulus relevant (CD autologues) ou irrelevant (CD allogéniques) permet de conclure au caractère spécifique ou non de la production d'IFN- γ mesurée.

Cette même stratégie sera employée pour analyser la spécificité de la production d'IFN- γ après culture prolongée en situation allogénique.

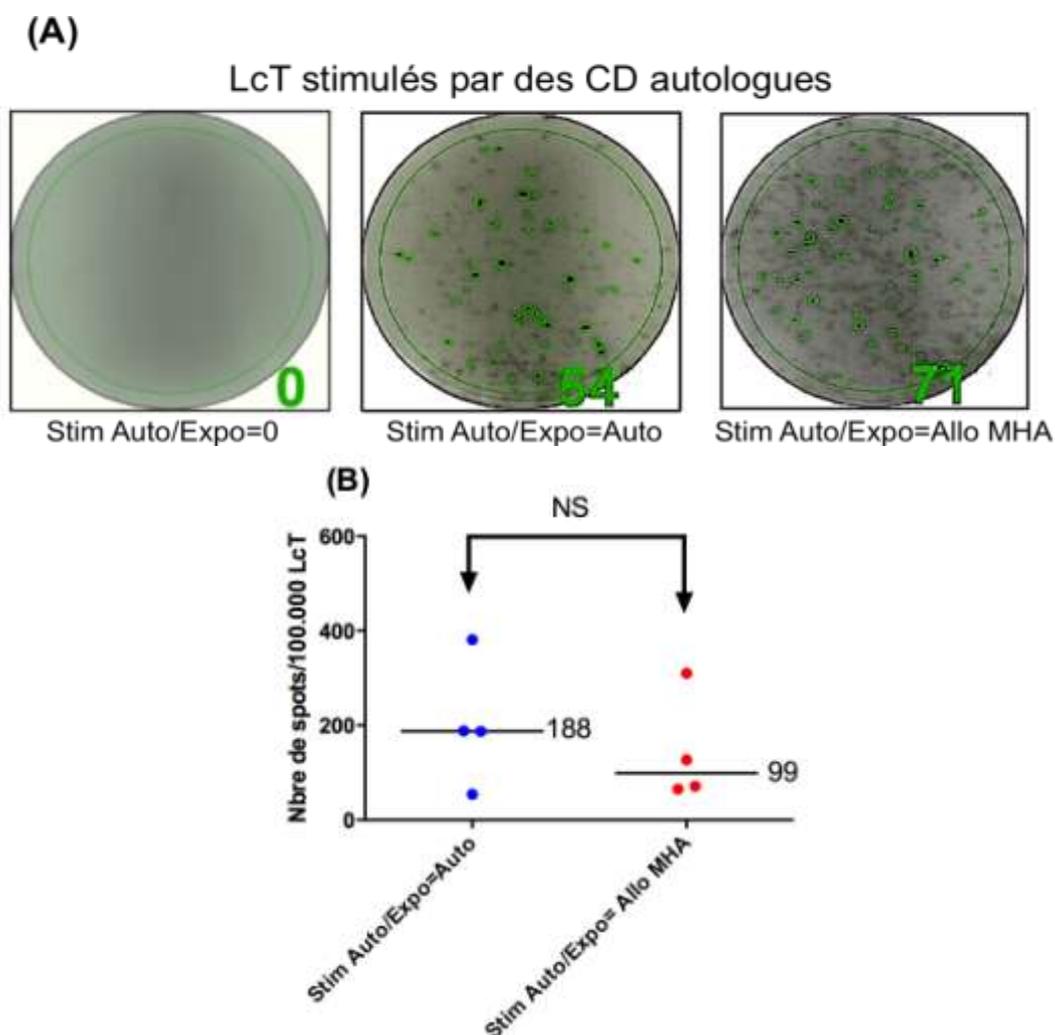


Figure 25 : Production d'IFN- γ au décours d'une culture prolongée des LcT en condition autologue. (A) Images scannées des puits d'ELISPOT, exemple représentatif. Révélation après exposition brève (20h) de LcT issus d'une culture autologue à un stimulus ou pas. La valeur du puits de LcT non exposés à un stimulus est déduite des autres puits avec exposition aux CD autologues ou allogéniques. (B) Représentation de la production spontanée d'IFN- γ par des lymphocytes stimulés par des CD autologues et exposés au stimulus initial ou à un stimulus différent. Le trait horizontal représente la médiane. La différence entre ces deux bruits de fond en nombre de spots est non significative ($p=0,144$)

4.2.2.2 Analyse de la production spécifique d'IFN- γ après stimulation prolongée par des cellules dendritiques allogéniques (mismatch HLA)

Après avoir observé une prolifération cellulaire importante dans les conditions de stimulation allogénique, on se propose d'évaluer la fonctionnalité des lymphocytes par test ELISPOT.

Pour quantifier la production d'IFN- γ spécifiquement engendrée par la réaction alloréactive des LcT envers des antigènes majeurs d'histocompatibilité, nous avons d'abord soustrait la valeur du puits [Stim Allo MHA/Expo=0] aux autres conditions testées.

Ensuite, pour l'analyse de la réponse effectrice spécifique aux antigènes majeurs d'histocompatibilité nous avons comparé la sécrétion d'IFN- γ des LcT stimulés et exposés aux MHA à la production d'IFN- γ de ces même LcT exposés à des CD autologues correspondant au bruit de fond non spécifique.

L'étude des 4 sujets montre une différence nette entre le nombre de spots pour les conditions [Stim Allo MHA/Expo= Allo MHA : médiane=444] et [Stim Allo MHA/Expo= Auto : médiane=17] (Figure 26.B). Cependant la comparaison des moyennes pour ces deux conditions est non significative selon le test de Wilcoxon ($p=0,068$) devant la faiblesse statistique de l'échantillon étudié ($n=4$).

Au total, l'évaluation de la réponse fonctionnelle spécifique aux MHA en IFN- γ est calculée après soustraction du nombre de spots obtenu en condition [Stim Allo MHA/Expo=Auto] à la condition [Stim Allo MHA/Expo=Allo MHA]. On observe que selon les sujets, on obtient une variabilité de cette réponse alloréactive spécifique avec un nombre de spots allant de 232 à 557 spots (Figure 26.C).

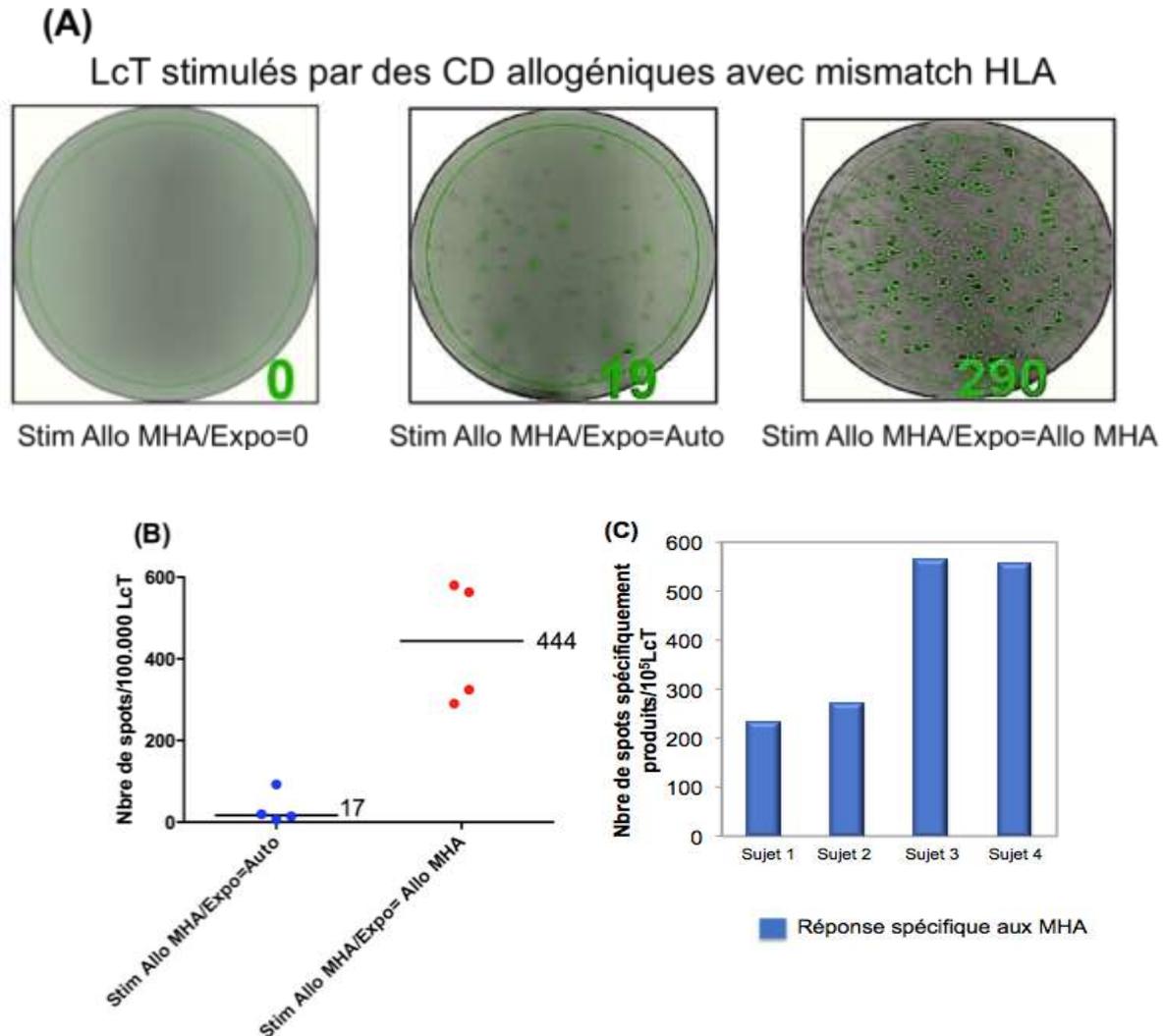


Figure 26 : Production d'IFN- γ par les lymphocytes stimulés par des CD allogéniques (MHA).

(A) Images scannées des puits d'ELISPOT, exemple représentatif. Révélation après exposition brève (20h) de LcT issus d'une culture allogénique à un stimulus ou pas. La valeur du puits des LcT non exposés à un stimulus sera déduite des autres puits avec exposition aux CD autologues ou allogéniques.

(B) Réponse fonctionnelle en INF- γ lors de l'exposition des LcT stimulés en condition allogénique (MHA) à des CD allogéniques ou autologues. Le trait horizontal représente la valeur médiane.

(C) Production spécifique d'IFN- γ relative à l'effet des antigènes majeurs d'histocompatibilité (MHA) pour chaque sujet étudié: Réponse spécifique en nombre de spots = puits [Stim Allo MHA/Expo= Allo MHA] – puits [Stim Allo MHA/Expo=Auto].

4.3 ÉTUDE DE LA RÉPONSE ALLORÉACTIVE DES LYMPHOCYTES T EN SITUATION D'INCOMPATIBILITÉ EN ANTIGÈNES MINEURS

4.3.1 **Suivi des numérations lymphocytaires au cours de la culture**

Devant les résultats obtenus lors de l'étude de la viabilité des lymphocytes T après culture prolongée (cf 4.1), nous avons ajouté de l'IL-2 et de l'IL-7 pour l'ensemble des cultures testant l'alloréactivité aux antigènes mineurs.

Après 11 jours de culture avec ajout d'IL-2 et d'IL-7, 84% des lymphocytes T cultivés **isolément** sont considérés comme viables (médiane des numérations à J11: 168.182 LcT). Sur le cytogramme, la majorité des lymphocytes T conserve une taille/structure de cellules quiescentes.

Après co-culture prolongée, nous observons une prolifération des LcT stimulés avec des CD matures, aussi bien en condition autologue qu'en condition allogénique. Les cytogrammes montrent une augmentation de la taille et de la structure des lymphocytes T illustrant la prolifération dans chacune des conditions (Figure 27.A).

Les numérations sont très hétérogènes selon les sujets étudiés et ne permettent pas d'objectiver une prolifération plus importante dans la condition d'alloréactivité dirigée contre les antigènes mineurs. La figure 27.B montre que pour certains sujets la prolifération en condition autologue est équivalente voire supérieure à celle des LcT sensibilisés par des CD allogéniques. La différence entre les moyennes des numérations pour les 2 conditions de co-culture est non significative ($p=0,16$) selon le test statistique de Wilcoxon (Figure 27.C).

Ainsi, l'étude de la réponse alloréactive aux antigènes mineurs par la numération lymphocytaire ne met pas en évidence une prolifération plus intense comparée à la réponse autoréactive.

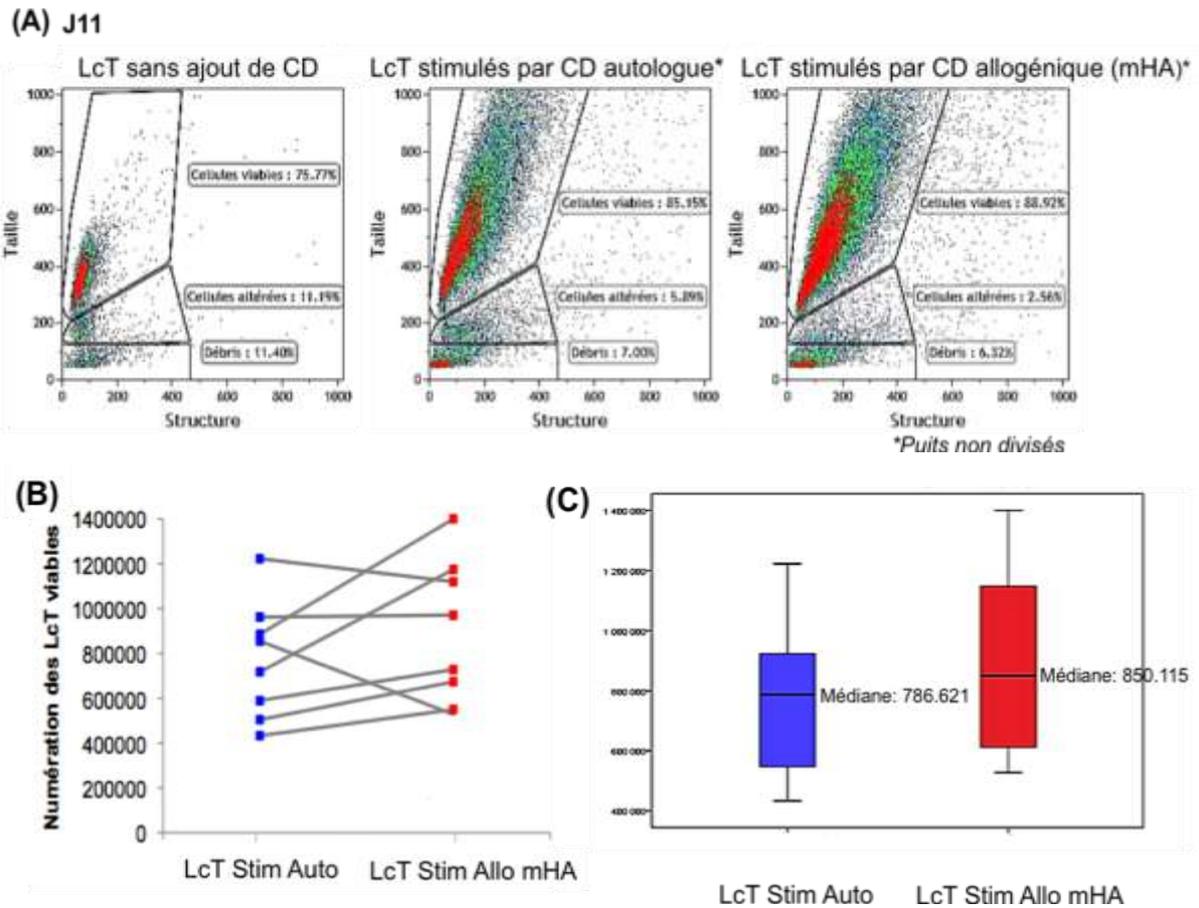


Figure 27 : Numération lymphocytaire à J11 pour les 8 cultures HLA-identiques.

(A) Exemple représentatif des cytogrammes obtenus à J11 pour les cultures de LcT sans ajout de CD, pour les cultures autologues et allogéniques (mHA). Les cytogrammes sont obtenus sans division préalable des puits de culture. **(B)** Numération en valeurs absolues des lymphocytes T stimulés en conditions autologues et allogéniques (mHA) sur les 8 cultures réalisées en conditions HLA-identiques (Couples A à D). **(C)** Représentation de la médiane des numérations lymphocytaires à J11 pour les deux cultures avec stimulation par des cellules dendritiques.

4.3.2 Approche fonctionnelle par analyse de la sécrétion d'IFN- γ

Comme pour l'étude de l'alloréactivité aux antigènes majeurs, nous avons étudiés par ELISPOT IFN- γ l'effet des antigènes mineurs sur la réactivité lymphocytaire pour 4 couples HLA-identiques.

4.3.2.1 Analyse de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T stimulés par des cellules dendritiques autologues

Devant une prolifération lymphocytaire importante en condition de culture autologue avec addition d'IL-2 et d'IL-7, nous avons à nouveau évalué le nombre de cellules productrices d'IFN- γ après stimulation autologue prolongée.

Pour évaluer la spécificité de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T vis-à-vis des auto-antigènes présentés par les CD autologues, les cellules productrices d'IFN- γ sont, au terme de la culture prolongée, exposées pendant 20 heures soit à des CD autologues, soit à des CD allogéniques en antigènes mineurs.

Nos résultats révèlent un nombre médian de spots de 347 et de 348 après exposition finale à des CD autologues ou allogéniques respectivement (Figure 28).

Ceci nous permet de conclure que les cellules productrices d'IFN- γ recueillies à la fin de cette culture ne sont pas des cellules répondant spécifiquement aux auto-antigènes mais des cellules T activées produisant de l'IFN- γ de manière non spécifique au terme d'une culture prolongée en présence de CD autologues.

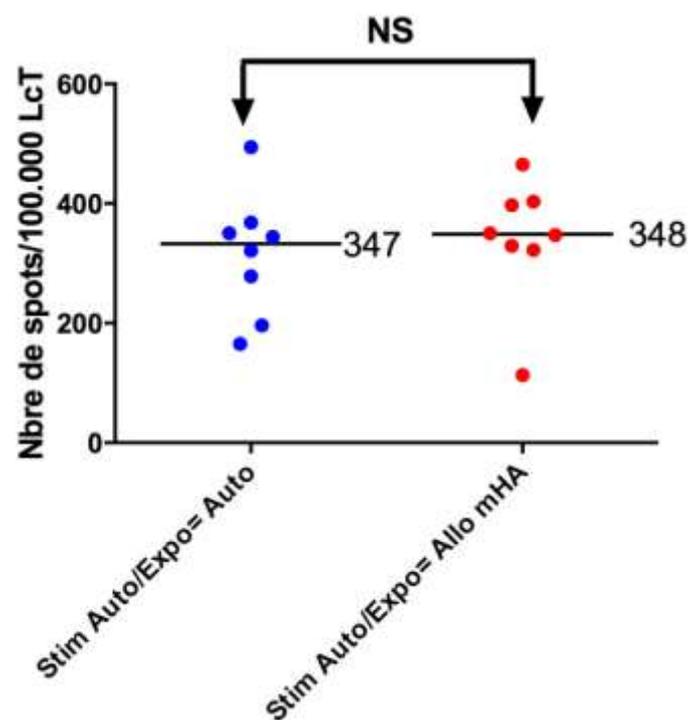


Figure 28 : Numération de cellules T productrices d'IFN- γ par ELISPOT après stimulation en condition autologue en milieu additionné d'IL-2 et d'IL-7.

Le trait horizontal représente la médiane. La différence entre ces deux expositions finales en nombre de spots est non significative ($p=0,39$). Pour les 8 cultures avec CD autologues, la quantification des spots d'IFN- γ est réalisée après une exposition brève à des CD autologues [Stim Auto/Expo=Auto] ou allogéniques [Stim Auto/Expo=Allo mHA] avec mismatch en antigènes mineurs.

Ainsi, comme après une culture prolongée en IL-2 seule (nombre médian de spots d'IFN- γ à 188), il existe en présence d'IL-2 et d'IL-7 une production non spécifique d'IFN- γ mais cette fois plus importante (nombre médian de spots d'IFN- γ à 347).

Au total, ces résultats montrent que la comparaison de deux sources antigéniques différents pour l'exposition finale lors du test ELISPOT IFN- γ est une approche indispensable pour conclure ou non à la spécificité de la production d'IFN- γ observée.

Ce raisonnement est appliqué pour la recherche d'une réponse allogénique spécifique aux antigènes mineurs par mesure des cellules productrices d'IFN- γ en ELISPOT.

4.3.2.2 Analyse de la production d'IFN- γ spécifique après stimulation allogénique prolongée avec mismatches mineurs (mHA)

Comme pour les cultures menées en mismatch en antigènes majeurs, nous avons évalué le nombre de spots pour les puits [Stim Allo mHA/Expo=0] qui illustre la sécrétion résiduelle d'IFN- γ par des LcT sans exposition finale brève à des antigènes. Cette production spontanée d'IFN- γ est systématiquement soustraite aux deux autres conditions d'ELISPOT (exposition finale à des CD autologues ou allogéniques).

Pour l'analyse de spécificité de la réponse aux antigènes mineurs, nous avons comparé pour les 8 cultures HLA-identiques la sécrétion en IFN- γ des LcT stimulés aux mHA et exposés, lors de l'ELISPOT, soit à des CD allogéniques soit à des CD autologues. Nos résultats montrent une différence du nombre de spots entre les conditions [Stim Allo mHA/Expo=Allo mHA] et [Stim Allo mHA/Expo=Auto], médiane à 408 et 340 respectivement (Figure 29.B). La comparaison des moyennes entre ces deux conditions selon le test de Wilcoxon ($p=0,025$) montre une différence significative entre les deux conditions d'exposition finale et permet de conclure à une activation et une différenciation spécifique d'un contingent de cellules T par des alloantigènes mineurs.

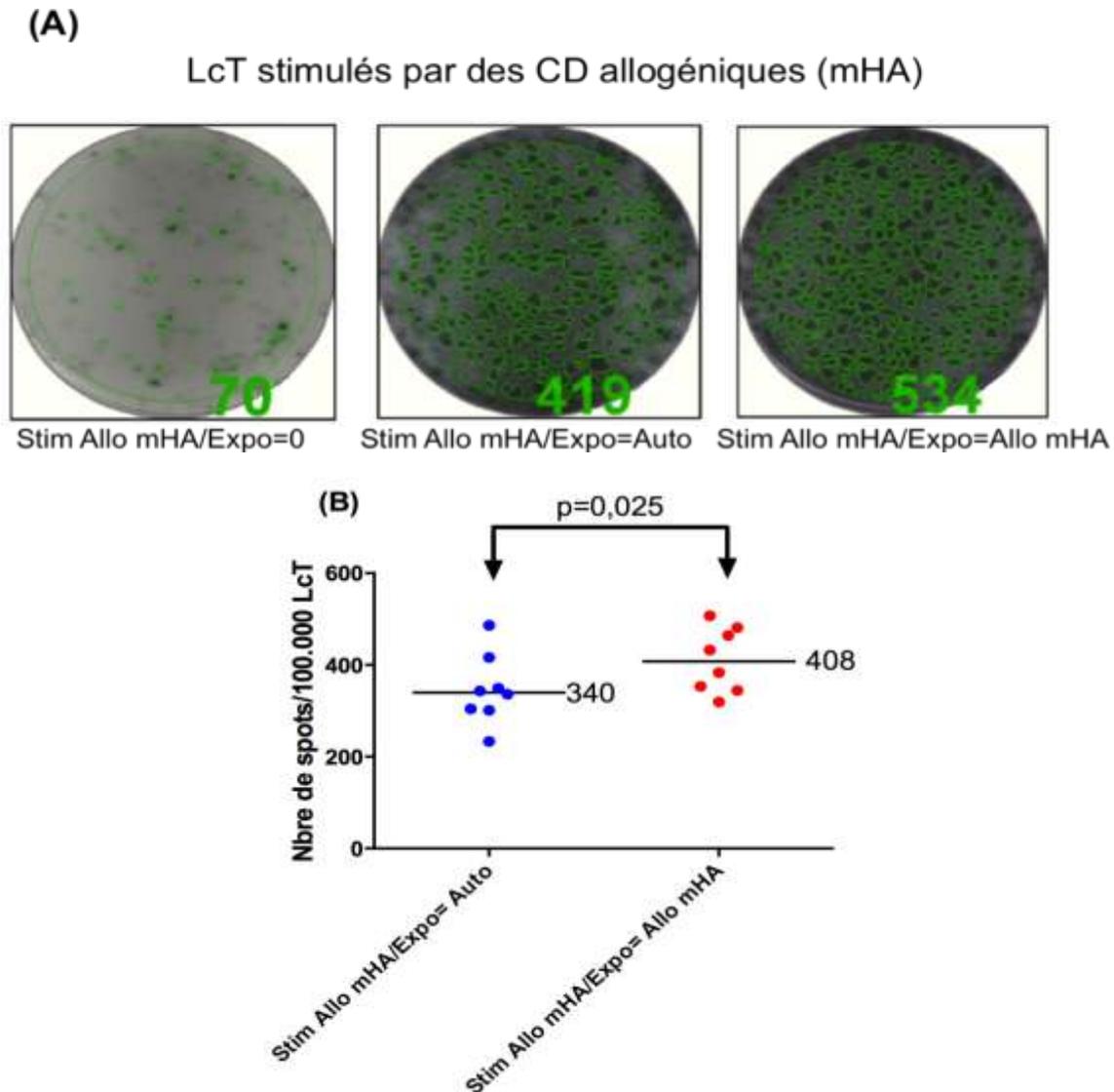


Figure 29 : Production d'IFN- γ au décours d'une culture prolongée de LcT en condition allogéniques (mHA).

(A) Images scannées des puits d'ELISPOT, exemple représentatif. Révélation après exposition brève (20h) de LcT issus d'une culture allogénique à un stimulus ou pas. La valeur du puits de LcT non exposés à un stimulus est déduite des autres puits avec exposition aux CD autologues ou allogéniques.

(B) Réponse fonctionnelle en INF- γ lors de l'exposition des LcT stimulés en condition allogénique (mHA) à des CD allogéniques ou autologues. Le trait horizontal représente la valeur médiane.

Nous avons quantifié pour chacune des 8 cultures la réponse spécifique aux mHA par la soustraction du nombre de spots obtenu en condition [Stim Allo mHA/Expo= Auto] à la condition [Stim Allo mHA/Expo=Allo mHA].

Le calcul du nombre de spots attribuable à la réponse spécifique aux mHA permet de distinguer deux nuages de points: le premier regroupe les valeurs les plus élevées [67 à 120 spots] encadrant la valeur médiane de l'ensemble des 8 cultures, l'autre est composé de 3 valeurs faibles voire négatives [-5 ;1 ;18]. On définit ainsi deux groupes de sujets répondant différemment aux antigènes mineurs en se basant sur cette évaluation fonctionnelle. Le groupe 1 est considéré comme fortement répondeur et comprend 5 sujets. Le groupe 2 comprend 3 sujets (soit 37,5% des volontaires étudiés), pour ces puits la réponse spécifique aux antigènes mineurs est faible voire nulle en ELISPOT (Figure 30).

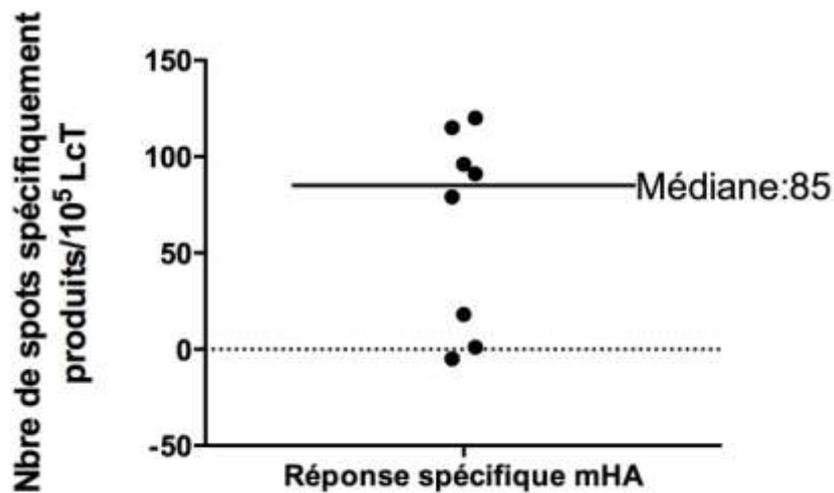


Figure 30: Étude de la production spécifique d'IFN- γ après stimulation allogénique prolongée avec mismatches mineurs (mHA) pour les 8 cultures HLA-identiques. La production d'IFN- γ spécifique (en nombre de spots) est obtenue par soustraction de la valeur en condition [Stim Allo mHA/Expo=Auto] à celle de la condition [Stim Allo mHA/Expo=Allo mHA].

Il existe une différence statistiquement significative entre le nombre de spots moyen du groupe 1 et du groupe 2 (Test de Mann et Withney, $p=0,036$).

On peut donc au sein d'un groupe de sujets HLA-identiques distinguer deux groupes de sujets selon leurs capacités à développer une réponse alloréactive en antigènes mineurs en évaluant celle-ci par la production d'IFN- γ en ELISPOT.

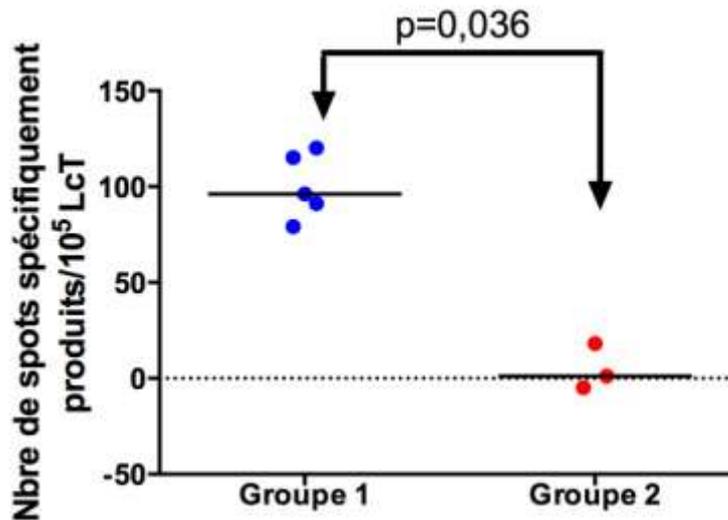


Figure 31 : Réponse spécifique aux mHA évaluée par la sécrétion d'IFN- γ en fonction des groupes de sujets. La comparaison des moyennes entre les deux groupes est significativement différente ($p=0,036$). Le trait horizontal représente la valeur médiane. Groupe 1 : réponse spécifique aux mHA évaluée en nombre de spots d'IFN- γ avec valeurs élevées ($n=5$) ; Groupe 2 : réponse spécifique aux mHA évaluée en nombre de spots d'IFN- γ avec valeurs faibles voire nulles ($n=3$)

Nous avons finalement quantifié selon ce même mode de calcul la production spécifique d'IFN- γ obtenues en mismatch HLA (4 cultures) et en condition HLA-identique (8 cultures).

Les cultures des sujets 1 à 4 menées en situation HLA-incompatible (illustré en bleu) possèdent une réponse en nombre de spots supérieure à celle obtenue en incompatibilité en antigènes mineurs (8 cultures, illustration en rouge) (Figure 32.A).

De manière attendue, la réponse aux antigènes majeurs d'histocompatibilité est significativement supérieure ($p=0,007$) (Figure 32.B).

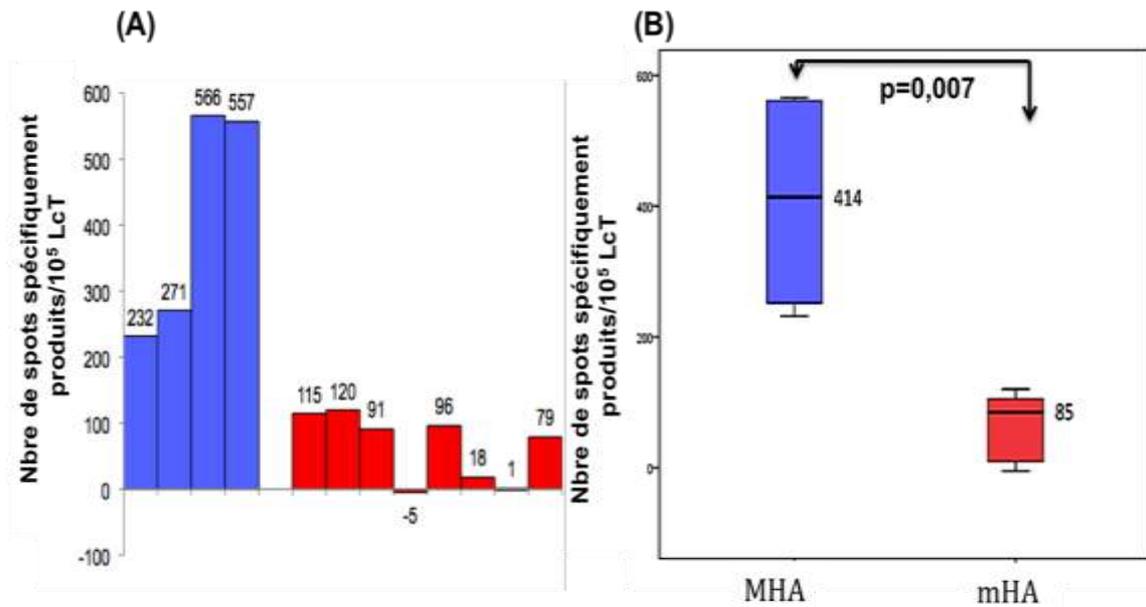


Figure 32 : Comparaison des réponses spécifiques envers les antigènes majeurs d'histocompatibilité et les antigènes mineurs. **(A)** Variabilité de la réponse fonctionnelle spécifique en IFN- γ selon les sujets et la nature des antigènes étudiés. **(B)** Représentation statistique des réponses spécifiques selon la nature des antigènes impliqués dans l'alloréactivité lymphocytaire. Le trait horizontal symbolise la valeur médiane en nombre de spots/100.000 LcT.

5 DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'élaborer un test *in vitro* prédictif de l'effet GvH pour des couples Donneurs/Receveurs HLA-identiques reposant sur un modèle de réaction lymphocytaire mixte (MLR).

L'utilisation du principe de la réaction lymphocytaire mixte dans l'allogreffe de CSH n'est pas nouvelle. Ce modèle *in vitro* de la réaction allogénique *in vivo* a été utilisé autrefois pour prédire la compatibilité d'un couple Donneur/Receveur. Dans les années 80, les typages HLA (A,B,C,DR) étaient réalisés par sérologie. Ils étaient loin de distinguer l'ensemble des incompatibilités en antigènes majeurs⁹⁷. Ainsi la MLR permettait d'évaluer la survenue d'une GvH par l'analyse de la prolifération lymphocytaire du donneur lors de la mise en culture avec des cellules du receveur irradiées. De même, le rejet de greffe était modélisé par l'alloréactivité des lymphocytes du receveur envers des cellules du donneur irradiées. Cependant, cette technique fût abandonnée du fait de la difficulté d'interprétation et devant les progrès des typages HLA réalisés en biologie moléculaire. Rappelons qu'aujourd'hui grâce aux outils de biologie moléculaire, le typage HLA allélique sans ambiguïté est requis pour le HLA-A,B,C,DR et DQ.

Au plan technique, les modalités d'étude de la MLR étaient limitées. L'isolement des lymphocytes T n'était pas envisageable⁹⁸ et la culture était réalisée sur une durée courte de 6 jours, la viabilité cellulaire ne pouvant être préservée au delà de cette période faute d'ajout de cytokines. De même, la possibilité de développer une réaction lymphocytaire mixte sensibilisée par des cellules dendritiques n'était alors pas envisageable car la différenciation des monocytes circulants en CD matures n'était pas maîtrisée. Enfin, l'évaluation de l'alloréactivité lymphocytaire était basée sur la seule mesure de la prolifération, le plus souvent en thymidine tritiée, technique peu sensible.

Ainsi, l'idée d'évaluer le degré d'alloréactivité lymphocytaire par ce modèle était séduisante à l'époque mais n'a pu aboutir, faute d'outils permettant de sensibiliser la MLR et de quantifier la réponse aux antigènes en dehors d'une approche de la réponse proliférative par thymidine tritiée.

Comme nous l'avons expliqué en introduction, nous sommes en pratique toujours confrontés au risque de survenue d'une réaction de GvH lors d'une allogreffe de CSH malgré le respect de la compatibilité HLA en antigènes majeurs entre les couples Donneur/Receveur.

Si une GvH de grade I n'est en général pas problématique et même un signe indirect d'une possible réaction de GvL, la survenue d'une GvH aiguë de grade élevé demeure un des problèmes majeurs en allogreffe de CSH.

Ainsi, devant le manque d'outils permettant de prédire la survenue d'une GvH aiguë chez les greffés, notre équipe se propose de quantifier la réponse alloréactive aux antigènes mineurs (mHA) pour des couples HLA-compatibles en modélisant la réaction par une approche *in vitro*. Notre objectif est de standardiser un modèle de culture prolongée basé sur une réaction mixte lymphocytaire sensibilisée (MLDCR) en s'appuyant sur des techniques modernes et sensibles. À terme, par cette approche, nous souhaitons quantifier l'alloréactivité des cellules T du greffon (cellules répondeuses du donneur) en co-culture avec des cellules dendritiques matures du receveur (cellules stimulantes) lors de greffes HLA-identiques.

La modélisation de la réaction de GvH par la MLDCR nous semble pertinente. Elle est utilisée dans de nombreuses études à des fins d'immunothérapie^{99,100}. En effet, les cellules dendritiques préalablement dérivées de monocytes circulants sont considérées comme les cellules les plus efficaces pour une présentation antigénique aux lymphocytes T du donneur^{101,102}. De plus, chez le receveur d'allogreffe de CSH, les cellules dendritiques résistant au conditionnement sont à l'origine du déclenchement de la GVH aiguë.

Nous avons choisi de cultiver des lymphocytes T plutôt que des CMN pour centrer notre étude sur la réponse en évitant ainsi des biais d'interprétation de nos résultats liés à l'intervention potentielle de cellules NK. La MLDCR modélise ainsi les deux principaux acteurs cellulaires participant au mécanisme de GvH. De plus cette approche permet d'intégrer les lymphocytes T du donneur dont on sait que la composition en cellules T naïves et mémoires influence la survenue, la précocité et la gravité de la GvH aiguë¹⁰³.

Pour quantifier la réponse aux antigènes mineurs lors d'une MLDCR, nous avons opté pour la numération de cellules productrices d'IFN- γ par technique ELISPOT.

Ce choix a été orienté par les travaux de recherche antérieurs du laboratoire qui ont montré la faible sensibilité de la mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée lors de la MLDCR en situation HLA-identique. De ces mêmes travaux et des données de la littérature^{96,104,105} s'est aussi dégagée la nécessité d'une approche fonctionnelle par la technique ELISPOT après plusieurs stimulations antigéniques sur une période de culture prolongée. L'IFN- γ est une cytokine produite par les LcT CD4⁺ Th1 et les T CD8⁺ différenciées, effecteurs mémoires et effecteurs terminaux surtout. Elle joue un rôle crucial dans la réponse innée et adaptative et constitue l'une des cytokines clés lors de la réaction de GvH et de GvL¹⁰⁶.

Le principe de la technique ELISPOT est la détection des cellules produisant une cytokine, au niveau unicellulaire. Ces tests sont d'une grande sensibilité dans la mesure où la cytokine cible est capturée directement autour de la cellule sécrétrice, avant qu'elle ne soit diluée dans le surnageant, capturée par les récepteurs de cellules adjacentes ou encore dégradée. Ceci rend les tests ELISPOT beaucoup plus sensibles que les mesures ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) conventionnelles.

La synthèse de cytokines par les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ n'est pas constitutive. Elle nécessite quelques heures pour la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}) ou les effecteurs T terminaux (T_{EMRA}) d'où la nécessité d'une réexposition brève (20h) à l'antigène pour déclencher une production d'IFN- γ . Dans le cas de la quantification de cellules T spécifiques productrices d'IFN- γ générées *in vitro* après stimulation primaire et secondaire, certaines cellules T activées peuvent spontanément sécréter de l'IFN- γ . La réexposition brève à l'antigène permet de sensibiliser le test. Cette sensibilisation doit préserver la spécificité de la réponse, aussi avons-nous systématiquement comparé la réponse ELISPOT des cellules T stimulées lors d'une réexposition à l'antigène cible ou à un antigène irrelevant.

Enfin, pour faciliter la mise au point de notre protocole, nous avons testé l'efficacité de notre approche en situation d'incompatibilité en antigènes majeurs. Puis, nous

nous sommes placés secondairement en situation HLA-identique pour évaluer la pertinence de notre test à quantifier une réponse alloréactive aux antigènes mineurs.

Pour la mise au point de notre modèle de MLDCR nous avons veillé à l'élaboration de différentes cultures contrôles, primordiales pour l'interprétation de nos résultats.

Notre premier objectif était d'assurer une viabilité suffisante des lymphocytes T pour permettre de les cultiver isolément pendant 12 jours sans induire une prolifération cellulaire polyclonale non spécifique et sans modifier la répartition initiale T CD4⁺/T CD8⁺.

En effet, notre étude a montré qu'en conditions basales de culture la mortalité des lymphocytes T est majeure quelle que soit la nature du prélèvement étudié (CMN ou CSP). De manière rassurante, les cellules T isolées à partir de CSP ont un comportement similaire aux cellules fraîchement isolées du sang total d'adultes volontaires lorsque le prélèvement est acheminé rapidement au laboratoire (entre 1 à 5 heures après l'injection). Ceci atteste de la viabilité des cellules T du donneur injectées au receveur.

Nous avons choisi d'étudier les effets de l'ajout d'IL-2 et/ou d'IL-7. L'IL-2 est classiquement utilisée comme facteur de croissance pour favoriser la survie et la prolifération des cellules T *in vitro*. L'IL-7 joue un rôle primordial sur l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T et sur la survie des LcT naïfs et mémoires.

Les effets de ces 2 cytokines sont très dépendants de la dose utilisée et de nombreux travaux rapportent leur usage à forte dose pour induire l'expansion *ex vivo* de ces catégories de cellules à des fins d'immunothérapie¹⁰⁴.

On utilise pour notre test de très faibles concentrations d'IL-2 et d'IL-7 par souci d'éviter une prolifération polyclonale non spécifique de nos cellules qui empêcherait toute tentative de discernement d'une réponse spécifique de faible amplitude telle qu'on l'imagine avec les antigènes mineurs.

L'ajout conjoint d'IL-2 et d'IL-7 pour les deux types de prélèvements permet de maintenir une viabilité lymphocytaire satisfaisante sans induire dans la majorité des cas de lymphoprolifération (survie médiane de 73,6% des LcT initiaux) ni de modification du cytogramme. De plus, il n'y a pas d'impact sur la répartition des LcT CD4⁺ et T CD8⁺ au cours de la culture.

Seul un des sujets testés développe une réponse proliférative suite à l'ajout d'IL-2. Nous n'avons pas pratiqué au moment des prélèvements sanguins un immunophénotypage recherchant la présence de cellules T activées HLA-DR⁺ mais on peut penser que la présence d'un contingent de lymphocytes T activés *in vivo* a répondu *in vitro* à l'IL-2 en proliférant.

Nous avons, à chaque fois étudié, dans les différentes conditions de culture testées (culture prolongée avec addition d'IL-2 seule ou d'IL-2 et d'IL-7) la réponse des cellules T vis-à-vis de cellules dendritiques autologues. L'objectif des cultures prolongées en présence de cellules dendritiques autologues avec exposition finale brève aux mêmes CD autologues ou à des CD allogéniques était double : évaluer la sensibilité et la spécificité de notre outil mais aussi rationaliser notre façon de quantifier le nombre de cellules productrices d'IFN- γ spécifiquement.

Les MLDCR avec CD autologues montrent que la stimulation autologue des lymphocytes T induit une réponse proliférative comme l'indique les numérations lymphocytaires en fin de culture. Toutefois, au plan fonctionnel, la comparaison du nombre de cellules productrices d'IFN- γ après réexposition brève aux mêmes CD autologues ou à des CD allogéniques permet de conclure à une production d'IFN- γ non spécifique inhérente à des lymphocytes T autoréactifs. On ne peut pourtant exclure un manque de sensibilité de notre test à quantifier une réponse autoréactive devant l'absence de différence significative du nombre de spots selon la nature des CD utilisées lors de la réexposition.

L'équipe de Russell¹⁰⁷ s'est particulièrement intéressée à ce phénomène d'autoréactivité lymphocytaire propre à la réaction de MLR. Cette activation est considérée comme variable avec les différences importantes selon les individus. Elle est provoquée par la sécrétion d'IL-2 des populations cellulaires stimulantes en réponse à un contact avec des CPA autologues. Ce phénomène d'activation est amplifié par l'ajout au milieu de culture de sérum AB décomplémenté, source d'antigènes étrangers. D'ailleurs, notre mise au point a été réalisée avec le même lot de sérum AB par souci de reproductibilité des résultats. L'étude propose d'utiliser des milieux sans ajout de sérum « *serum free* » mais ils ne donnent pas des

conditions de cultures satisfaisantes. Une autre solution serait de cultiver les cellules avec le sérum du sujet pour être en condition autologue stricte. Enfin, l'irradiation des cellules stimulantes semble minimiser cette autoactivation sans pour autant la faire disparaître.

Il a été démontré que cette autoréactivité intrinsèque au principe de culture prolongée, n'a aucune incidence sur la survenue de GvH, sur le risque de rechute ainsi que sur la survie globale¹⁰⁸.

La réponse fonctionnelle des lymphocytes T vis-à-vis des antigènes majeurs d'histocompatibilité a été étudiée après deux stimulations des lymphocytes T par des CD allogéniques, puis exposition brève aux mêmes CD ou à des CD autologues. L'alloréactivité mesurée suite à une stimulation allogénique est très supérieure (médiane : 414 spots/ 10^5 LcT) lorsqu'on réexpose les cellules T à ce même stimulus. Cependant, la supériorité de la réponse du puits [StimAllo MHA/Expo=Allo MHA] est considérée comme non significative comparée aux valeurs du puits [Stim Allo MHA/Expo=Auto] ($p=0,068$) en raison de la petite taille de notre échantillon ($n=4$). Ainsi on met en évidence par ce modèle de culture, l'induction d'une réponse spécifique en IFN- γ lors d'une incompatibilité en antigènes majeurs entre les cellules répondeuses et les cellules stimulantes.

Devant l'efficacité du modèle expérimental en mismatch majeur, le protocole est testé sur quatre couples HLA-identiques volontaires issus de fratries afin d'étudier notre capacité à quantifier par ce test une réponse alloréactive aux antigènes mineurs. Nos résultats montrent que la production d'IFN- γ par les lymphocytes stimulés à 2 reprises par des CD allogéniques (mHA) est significativement supérieure lors de leur exposition finale brève à ces mêmes antigènes mineurs ($p=0,025$, $n=8$). La réponse médiane spécifique en IFN- γ dirigée contre les antigènes mineurs est de 85 spots/ 10^5 LcT. De manière attendue, le nombre de cellules T productrices d'IFN- γ *in vitro* est inférieur à celui engendré par une incompatibilité en antigènes majeurs ($p=0,007$), l'incidence de la GvH aiguë étant directement corrélée au degré de disparité HLA. Rappelons qu'une GvH aiguë survient dans 60 à 80% des cas en cas de donneur avec une compatibilité HLA 9/10¹⁰⁹.

L'analyse détaillée de nos 8 cultures a permis de distinguer deux types de réponses en IFN- γ (positive/faible ou nulle) pour les sujets HLA-identiques. Ainsi pour 37,5% de notre échantillon on constate une quasi-absence d'alloréactivité dirigée contre les mHA. Ces résultats préliminaires sont en phase avec les données cliniques qui indiquent, selon la littérature, que 40% à 60% des greffes HLA-compatibles ne vont pas induire de GvH chez le receveur. À l'inverse, si on extrapole pour les autres sujets testés la réponse importante en IFN- γ , ils seraient plus susceptibles de développer une réaction de GvH de grade élevé.

Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confrontés à la clinique lors de l'étude prospective qui sera menée par notre équipe dans les prochains mois sur des couples Donneur/Receveur compatibles.

La réaction de GvH demeure la principale cause de morbidité et mortalité post-allogreffe, même lors de compatibilité HLA 10/10. L'objectif de ce protocole est de prédire la survenue d'une GvH chez un receveur par une approche *in vitro* réalisée en parallèle de la greffe. Une étude prospective est indispensable pour démontrer une corrélation de nos résultats avec les observations cliniques.

L'anticipation d'une GvH permettrait aux cliniciens de moduler le traitement immunosuppresseur. L'adaptation thérapeutique pour chaque patient basée sur l'allogénicité des antigènes mineurs permettrait de minimiser cette réaction néfaste tout en veillant à conserver un effet anti-tumoral. À l'heure actuelle, aucun traitement ne permet la prévention optimale de la GvH. Devant l'hétérogénéité des protocoles immunosuppresseurs en Europe, un groupe de travail tente d'élaborer des recommandations pour standardiser les pratiques¹¹⁰. À long terme l'étude de l'alloréactivité des cellules du donneur envers celles du receveur pourrait être un outil pour adapter les posologies en fonction des couples Donneur/Receveur.

Les symptômes de GvH aiguë apparaissent en moyenne dans les 2 à 3 semaines post-greffe¹¹¹. Notre protocole nécessitant des stimulations multiples et une culture prolongée, le rendu des résultats n'est envisageable qu'à J12 post-greffe. Ce délai s'explique par le souci d'isoler les lymphocytes T du donneur à partir de la CSP injectée à J0. Pour notre approche, ce raisonnement semble pertinent dans la mesure où il sera plus facile pour des donneurs non apparentés (souvent étrangers) d'isoler leurs lymphocytes sur le prélèvement de CSP. De plus, nous travaillons sur les cellules injectées au receveur, par souci d'obtenir un modèle de culture *in vitro*

s'approchant au maximum des réactions *in vivo*.

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble de notre travail nous a permis de développer un test *in vitro* évaluant le degré d'alloréactivité des lymphocytes T d'un sujet vis-à-vis d'antigènes mineurs.

Cette approche a d'abord été validée en situation HLA-incompatible sur quatre sujets volontaires pour s'assurer de la pertinence de notre modèle car l'alloréactivité est alors importante et facile à objectiver. L'étude de quatre couples HLA-identiques a ensuite permis de conclure à la possibilité de détecter chez certains sujets une réponse fonctionnelle spécifique aux antigènes mineurs par l'évaluation de la sécrétion d'IFN- γ (technique ELISPOT).

La mise en évidence de réponses variables selon les sujets (réponse positive/faible ou absente) permet de distinguer deux profils de réactivités assez similaires aux grades de GvH aiguë observés en clinique. L'application de ce test en prospectif avec un suivi clinique des receveurs de CSH HLA-identiques permettra de confronter les résultats obtenus avec ce test *in vitro* à la survenue ou non d'une GvH *in vivo* et son grade.

Le typage de certains antigènes mineurs doit être réalisé pour l'ensemble de nos sujets HLA-identiques afin de compléter notre analyse. En effet, certains mismatches en antigènes mineurs pourraient engendrer une alloréactivité lymphocytaire plus importante. Toutefois, nous n'avons pas observé de corrélation entre la réponse en IFN- γ et le mismatch H-Y dans nos cultures.

À ce stade de développement de notre test seule l'IFN- γ a été étudiée. Nous nous proposons de compléter l'approche fonctionnelle par l'étude d'autres cytokines associées à des profils différents (Th1, Th2, Th17). Nous avons pris la précaution de congeler l'ensemble des surnageants des cultures HLA-identiques lors de notre étude pour mener à bien ces investigations complémentaires.

L'évaluation de la capacité anti-tumorale des cellules T du greffon est l'autre objectif que nous aimerions poursuivre.

Cet objectif pourrait s'appuyer également sur la réaction mixte lymphocytaire sensibilisée avec cette fois des cellules dendritiques présentant des antigènes

VI. Conclusions et perspectives

tumoraux. La préparation d'un lysat de cellules leucémiques du patient au moment du diagnostic pourrait constituer la source antigénique destinée à sensibiliser les propres cellules dendritiques du futur receveur. L'activation des lymphocytes T du greffon induite par l'alloreconnaissance indirecte des antigènes tumoraux serait également évaluée par la sécrétion d'IFN- γ spécifique. Cette réponse aux stimuli blastiques nous permettrait de modéliser *in vitro* l'effet GvL d'un greffon chez un receveur et de l'extrapoler à la probabilité de rechute du patient. Le protocole en est à ses balbutiements, la difficulté étant d'assurer une présentation efficace des antigènes blastiques par les cellules dendritiques. Néanmoins, nous disposons pour la réalisation de ce projet de données encourageantes de la littérature^{99,105,112}.

La finalisation à moyen terme de ces projets puis leur validation par une étude prospective menée en collaboration avec le service des Maladies du Sang du CHRU de Lille, permettraient dans l'idéal l'utilisation de ces outils comme aide à la stratégie de prise en charge des receveurs d'allogreffe de CSH.

7 BIBLIOGRAPHIE

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27;354(17):1813–26.
2. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3390–400.
3. Michallet M, Bilger K, Garban F, Attal M, Huyn A, Blaise D, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation after nonmyeloablative preparative regimens: impact of pretransplantation and posttransplantation factors on outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Jul 15;19(14):3340–9.
4. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive Immunotherapy of Acute Leukemia: Experimental and Clinical Results. *Cancer Res*. 1965 Oct 1;25(9 Part 1):1525–31.
5. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242–5.
6. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):340–52.
7. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*. 2004 May;4(5):371–80.
8. Korngold R, Sprent J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med*. 1978 Dec 1;148(6):1687–98.
9. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26;321(17):1174–8.
10. Sanz MA, Sanz GF. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia*. 2002 Oct;16(10):1984–91.
11. Mullighan CG, Petersdorf EW. Genomic Polymorphism and Allogeneic Hematopoietic Transplantation Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan;12(1, Supplement 1):19–27.
12. Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10006–10.
13. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):795–802.
14. Bleakley M, Riddell SR. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol Cell Biol*. 2011 Mar;89(3):396–407.
15. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 juin;20(2):171–87.
16. Linscheid C, Petroff MG. Minor histocompatibility antigens and the maternal immune response to the fetus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol New York N* 1989. 2013 Apr;69(4):304–14.

VII. Bibliographie

17. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2005 Dec;11(12):945–56.
18. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295–304.
19. Cahn J-Y, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1495–500.
20. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1550–61.
21. Iwasaki T, Hamano T, Saheki K, Kuroiwa T, Kataoka Y, Takemoto Y, et al. Effect of graft-versus-host disease (GVHD) on host hematopoietic progenitor cells is mediated by Fas-Fas ligand interactions but this does not explain the effect of GVHD on donor cells. *Cell Immunol*. 1999 Oct 10;197(1):30–8.
22. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5401–11.
23. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966 1967;62:21–78.
24. Loiseau P, Busson M, Balere M-L, Dormoy A, Bignon J-D, Gagne K, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2007 Aug;13(8):965–74.
25. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2012 Jan 5;119(1):296–307.
26. Stenger EO, Turnquist HR, Mapara MY, Thomson AW. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5088–103.
27. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jun 15;172(12):7393–8.
28. MacDonald KPA, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3955–63.
29. Matte-Martone C, Wang X, Anderson B, Jain D, Demetris AJ, McNiff J, et al. Recipient B cells are not required for graft-versus-host disease induction. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep;16(9):1222–30.
30. Markey KA, Banovic T, Kuns RD, Olver SD, Don ALJ, Raffelt NC, et al. Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5644–9.
31. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999 Jul 16;285(5426):412–5.

VII. Bibliographie

32. Wang X, Li H, Matte-Martone C, Cui W, Li N, Tan HS, et al. Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6426–37.
33. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):987–92.
34. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2754–9.
35. Kolb H-J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4371–83.
36. Murphy WJ, Blazar BR. New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*. 1999 Oct;11(5):509–15.
37. Willems E, Baron F, Baudoux E, Wanten N, Seidel L, Vanbellinghen J-F, et al. Non-myeloablative transplantation with CD8-depleted or unmanipulated peripheral blood stem cells: a phase II randomized trial. *Leukemia*. 2009;23(3):608–10.
38. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999 Oct 14;401(6754):708–12.
39. Macedo C, Orkis EA, Popescu I, Elinoff BD, Zeevi A, Shapiro R, et al. Contribution of naïve and memory T-cell populations to the human alloimmune response. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009 Sep;9(9):2057–66.
40. Ferrara JLM, Reddy P. Pathophysiology of Graft-Versus-Host Disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1):3–10.
41. Yi T, Chen Y, Wang L, Du G, Huang D, Zhao D, et al. Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):3101–12.
42. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):390–9.
43. Juvet SC, Whatcott AG, Bushell AR, Wood KJ. Harnessing Regulatory T Cells for Clinical Use in Transplantation: The End of the Beginning. *Am J Transplant*. 2014 février;n/a–n/a.
44. Negrin RS. Role of regulatory T cell populations in controlling graft vs host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011 Sep;24(3):453–7.
45. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3825–7.
46. Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4191–9.
47. Van den Brink MRM, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):273–81.
48. Welniak LA, Blazar BR, Anver MR, Willtrout RH, Murphy WJ. Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: Effects of conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000 Dec;6(6):604–12.

VII. Bibliographie

49. Van den Brink MR, Moore E, Ferrara JL, Burakoff SJ. Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity. *Transplantation*. 2000 Feb 15;69(3):446–9.
50. Socié G. Chronic GVHD: B cells come of age. *Blood*. 2011 Feb 17;117(7):2086–7.
51. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, Washel WS, Bhuiya NS, Cutler CS, et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2011 Feb 17;117(7):2275–83.
52. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*. 1979 May 10;300(19):1068–73.
53. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1981 Jun 18;304(25):1529–33.
54. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555–62.
55. Ringdén O, Hermans J, Labopin M, Apperley J, Gorin NC, Gratwohl A. The highest leukaemia-free survival after allogeneic bone marrow transplantation is seen in patients with grade I acute graft-versus-host disease. Acute and Chronic Leukaemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leuk Lymphoma*. 1996 Dec;24(1-2):71–9.
56. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D, Guyotat D, Rio B, Pico JL, et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet*. 1987 Jul 25;2(8552):175–8.
57. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991 Oct 15;78(8):2120–30.
58. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Biezen Av A v, Bandini G, Devergie A, et al. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):3877–86.
59. Falkenburg JHF, Warren EH. Graft versus Leukemia Reactivity after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Jan;17(1, Supplement):S33–S38.
60. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J, Chase A, et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):67–71.
61. Dazzi F, Szydlo RM, Cross NC, Craddock C, Kaeda J, Kanfer E, et al. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2712–6.
62. Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2001 Jul;7(7):789–94.
63. Stern M, de Wreede LC, Brand R, et al. Impact of graft-versus-host disease on relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, an EBMT megafile study. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2012:120: 469.
64. Brouwer RE, van der Hoorn M, Kluijn-Nelemans HC, van Zelderen-Bhola S, Willemze R, Falkenburg JH. The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses. *Hum Immunol*. 2000 Jun;61(6):565–74.

VII. Bibliographie

65. Spierings E, Kim Y-H, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2013 Aug;19(8):1244–53.
66. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
67. Storb R, Thomas ED. Graft-versus-host disease in dog and man: the Seattle experience. *Immunol Rev*. 1985 Dec;88:215–38.
68. Ordemann R, Hutchinson R, Friedman J, Burakoff SJ, Reddy P, Duffner U, et al. Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1249–56.
69. Arora M, Weisdorf DJ, Spellman SR, Haagenson MD, Klein JP, Hurley CK, et al. HLA-Identical Sibling Compared With 8/8 Matched and Mismatched Unrelated Donor Bone Marrow Transplant for Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 1;27(10):1644–52.
70. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5695–702.
71. Remberger M, Mattsson J, Hassan Z, Karlsson N, LeBlanc K, Omazic B, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease grades II-IV after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with unrelated donors: a single centre study. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Feb;41(4):399–405.
72. Wang Z, Sorrow ML, Leisenring W, Schoch G, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. The impact of donor type and ABO incompatibility on transfusion requirements after nonmyeloablative haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2010 Apr;149(1):101–10.
73. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. 2010 Aug 1;12(4):322–9.
74. Miller W, Flynn P, McCullough J, Balfour HH Jr, Goldman A, Haake R, et al. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood*. 1986 Apr;67(4):1162–7.
75. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006 Jan;91(1):78–83.
76. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep;16(9):1309–14.
77. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2240–5.
78. Grefte A, van der Giessen M, van Son W, The TH. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis*. 1993 Feb;167(2):270–7.

VII. Bibliographie

79. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2001 Jan 18;344(3):175–81.
80. Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, Bredeson C, Hubesch L, Howson-Jan K, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1525–31.
81. Robinet E, Lapierre V, Tayebi H, Kuentz M, Blaise D, Tiberghien P. Blood versus marrow hematopoietic allogeneic graft. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. 2003 Aug;29(1):53–9.
82. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2962–71.
83. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004 Nov 25;351(22):2276–85.
84. Cantó E, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Distinctive response of naïve lymphocytes from cord blood to primary activation via TCR. *J Leukoc Biol*. 2003 Dec;74(6):998–1007.
85. Liu D, Yan C, Xu L, Wang Y, Han W, Zhang X, et al. Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe acute graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Nov;16(11):1567–75.
86. Harris AC, Ferrara JLM, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br J Haematol*. 2013;160(3):288–302.
87. Yakoub-Agha I, Saule P, Depil S, Grutzmacher C, Boulanger F, Magro L, et al. Comparative analysis of naïve and memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics. *Exp Hematol*. 2007 Jun;35(6):861–71.
88. Yakoub-Agha I, Saule P, Magro L, Cracco P, Duhamel A, Coiteux V, et al. Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28negative CD8+ T cells on relapse. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009 Apr;15(4):496–504.
89. Wolf D, Wolf AM, Fong D, Rumpold H, Strasak A, Clausen J, et al. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2007 Apr 27;83(8):1107–13.
90. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeiliah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1291–7.
91. Hippen KL, Riley JL, June CH, Blazar BR. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin Immunol*. 2011 Dec;23(6):462–8.
92. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, Trauet J, Coiteux V, Jouet J-P, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct;45(10):1546–52.
93. Thiant S, Labalette M, Trauet J, Coiteux V, de Berranger E, Dessaint J-P, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Oct;46(10):1374–81.

VII. Bibliographie

94. Levine JE, Logan BR, Wu J, Alousi AM, Bolaños-Meade J, Ferrara JLM, et al. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood*. 2012 Apr 19;119(16):3854–60.
95. Bund D, Buhmann R, Gökmen F, Kremser A, Dreyssig J, Kolb HJ, et al. Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies. *Cell Immunol*. 2010;263(1):88–98.
96. Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau J-F, Larsson M, Da Silva I, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine*. 2002 Dec 19;20, Supplement 4:A8–A22.
97. Widmer MB, Alter BJ, Bach FH, Bach ML. Lymphocyte reactivity to serologically undetected components of the major histocompatibility complex. *Nature New Biol*. 1973 Apr 25;242(121):239–41.
98. Sharp TA, Gress RE, Sachs DH, Rosenberg SA. Assessment of mixed lymphocyte reactivity in human bone marrow cell cultures. *Transplantation*. 1985 Nov;40(5):551–6.
99. Lee J-J, Choi B-H, Kang H-K, Kim S-K, Nam J-H, Yang D-H, et al. Monocyte-derived dendritic cells from HLA-matched allogeneic donors showed a greater ability to induce leukemic cell-specific T cells in comparison to leukemic cell-derived dendritic cells or monocyte-derived dendritic cells from AML patients. *Leuk Res*. 2008 Nov;32(11):1653–60.
100. Bund D, Buhmann R, Gökmen F, Zorn J, Kolb H-J, Schmetzer HM. Minor histocompatibility antigen UTY as target for graft-versus-leukemia and graft-versus-haematopoiesis in the canine model. *Scand J Immunol*. 2013 Jan;77(1):39–53.
101. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245–52.
102. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271–96.
103. Yakoub-Agha I, Saule P, Depil S, Micol J-B, Grutzmacher C, Boulanger-Villard F, et al. A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1557–65.
104. Distler E, Bloetz A, Albrecht J, Asdufan S, Hohberger A, Frey M, et al. Alloreactive and leukemia-reactive T cells are preferentially derived from naïve precursors in healthy donors: implications for immunotherapy with memory T cells. *Haematologica*. 2011 Jul 1;96(7):1024–32.
105. Moeller I, Spagnoli GC, Finke J, Veelken H, Houet L. Uptake routes of tumor-antigen MAGE-A3 by dendritic cells determine priming of naïve T-cell subtypes. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Nov 1;61(11):2079–90.
106. Wang H, Yang Y-G. The complex and central role of interferon- γ in graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity. *Immunol Rev*. 2014;258(1):30–44.
107. Russell CA, Petersen SL, Heilmann C, Madsen HO, Vindeløv LL. Autoreactivity, backstimulation and reproducibility in a helper T lymphocyte precursor assay. *J Immunol Methods*. 2001 May 1;251(1-2):109–21.
108. Russell CA. Alloreactivity and the predictive value of anti-recipient specific interleukin 2 producing helper T lymphocyte precursor frequencies for alloreactivity after bone marrow transplantation. *Dan Med Bull*. 2002 May;49(2):89–108.
109. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):1923–30.

VII. Bibliographie

110. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Dec 23;
111. Garnett C, Apperley JF, Pavlů J. Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol.* 2013 Dec;4(6):366–78.
112. Lee J-J, Nam C-E, Nam J-H, Lee H-C, Chung I-J, Park M-S, et al. Generation of cytotoxic donor CD8+ T cells against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. *Leuk Res.* 2004 May;28(5):517–24.

Université de Lille 2
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MÉMOIRE de DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2013/2014

Nom : VARLET

Prénom : Pauline

Titre du mémoire / thèse :

**ALLORÉACTIVITÉ DES LYMPHOCYTES T DANS LA GREFFE DE CELLULES
SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES :
DÉVELOPPEMENT D'UN TEST *IN VITRO* PRÉDICTIF DE LA RÉACTION DU
GREFFON CONTRE L'HÔTE *IN VIVO*.**

Mots-clés :

Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, Antigènes mineurs, Alloréactivité, Lymphocytes T, Cellules Dendritiques, Réaction du greffon contre l'hôte (GvH), Réaction du greffon contre la leucémie (GvL)

Résumé

Contexte : La principale complication de l'allogreffe de cellules souches HLA-identique reste la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), responsable d'une morbi-mortalité importante. Sa prévention demeure l'un des enjeux majeurs de la greffe. Notre objectif est d'élaborer un test prédictif *in vitro* permettant de quantifier en condition géno-identique, la capacité de réponse alloréactive des lymphocytes T du donneur vis-à-vis des antigènes mineurs du receveur.

Méthode : Test *in vitro* basé sur un modèle de réaction lymphocytaire mixte sensibilisée avec stimulations répétées par des cellules dendritiques matures en culture prolongée. Protocole mis au point en condition d'incompatibilité en antigènes majeurs d'histocompatibilité (n=4) puis réaliser en condition de compatibilité HLA 10/10 (n=8). L'alloréactivité lymphocytaire est évaluée au plan fonctionnel par la quantification de la production d'IFN- γ en technique ELISPOT.

Résultats : Nous détectons une production spécifique d'IFN- γ par les lymphocytes T en réponse à une stimulation répétée en antigènes mineurs (mHA). Nos résultats permettent de distinguer deux profils de réactivité : groupe 1, fortement répondeur aux mHA (n=5) et groupe 2, faiblement ou non répondeur aux mHA (n=3).

Conclusions et perspectives : La standardisation du protocole modélisant l'alloréactivité lymphocytaire envers les mHA lors de greffes géno-identiques nous permet d'obtenir des profils de réponses spécifiques en IFN- γ . Nous proposons l'exploration d'autres cytokines jouant un rôle dans la GvH. Afin de valider notre modèle, une étude prospective est nécessaire pour confronter nos résultats à la clinique. La mise au point d'un test prédictif de l'effet GvL selon les mêmes principes de culture est à l'étude.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Patrick DUTHILLEUL

Assesseurs : Monsieur le Docteur Leonardo MAGRO

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Directeur de thèse : Madame le Professeur Myriam LABALETTE