

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le 27 mai 2016
Par Mme Stéphanie ROGEAU**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Développement *in vitro* d'un protocole de déplétion automatisé en
lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de greffons haploidentiques de Cellules Souches
Hématopoïétiques Périphériques en vue d'en réduire le potentiel alloréactif**

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU**
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Pharmacie de Lille – CHRU de Lille

Assesseurs : **Madame le Docteur Pauline VARLET**
Assistant hospitalo-universitaire
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille
Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille

Directeur de thèse : **Madame le Professeur Myriam LABALETTE**
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le 27 mai 2016
Par Mme Stéphanie ROGEAU**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Développement *in vitro* d'un protocole de déplétion automatisé en
lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de greffons haploidentiques de Cellules Souches
Hématopoïétiques Périphériques en vue d'en réduire le potentiel alloréactif**

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU**
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Pharmacie de Lille – CHRU de Lille

Assesseurs : **Madame le Docteur Pauline VARLET**
Assistant hospitalo-universitaire
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille
Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille

Directeur de thèse : **Madame le Professeur Myriam LABALETTE**
Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille



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
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Éric KERCKHOVE Professeur Éric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DÉCAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
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 Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
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
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
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 Économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Éric	Droit et Économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

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

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie

M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBÈGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Économie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Économie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

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

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Économie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	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 Thierry BROUSSEAU

Professeur des Universités en Biochimie
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille 2

Praticien hospitalier, Chef de service de l'Unité Fonctionnelle d'Analyses
automatisées de Biochimie et Chef de pôle de Biologie,
Centre de Biologie Pathologie-Génétique, CHRU de Lille

Pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail

et de présider cette soutenance de thèse,

Pour vos qualités pédagogiques et humaines,

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance

et de mon profond respect.

À ma directrice de Thèse,

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Professeur des Universités en Immunologie
à la Faculté de Médecine Henri Warembourg, Université de Lille 2

Praticien hospitalier, Chef de service de l'Institut d'Immunologie,
Centre de Biologie-Pathologie-Génétique, CHRU de Lille

Je vous remercie de m'avoir confié cette thèse

et de m'avoir impliquée dans cet ambitieux projet.

Par votre rigueur, votre professionnalisme, vos connaissances, votre disponibilité,

vos conseils avisés vous m'avez beaucoup appris

et avez permis l'aboutissement de ce travail.

Après une révélation pour l'Immunologie à Rouen, je vous remercie

de m'avoir accueillie au sein de votre Laboratoire pendant 4 semestres,

je suis ravie de rester encore un peu.

Recevez mes sincères remerciements,

et soyez assurée de ma grande reconnaissance et de ma profonde estime.

À mes juges,

Madame le Docteur Pauline VARLET

Assistant hospitalo-universitaire

Institut d'Immunologie, Centre de Biologie-Pathologie-Génétique, CHRU de Lille

Faculté de Médecine Henri Warembourg, Université de Lille 2

Pour ton enseignement en cultures cellulaires et en cytométrie,

Pour ton soutien dans ce travail,

Pour tes conseils et ta disponibilité,

Tu me fais l'honneur de juger cette thèse,

Reçois l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Professeur des Universités en Hématologie
à la Faculté de Médecine Henri Warembourg, Université de Lille 2

Praticien hospitalier, Chef de service de l'Unité Fonctionnelle d'Allogreffe,
Service des Maladies du Sang, Hôpital Claude Huriez, CHRU de Lille

Pour avoir accepté de juger ce travail avec beaucoup de gentillesse,

Pour votre investissement dans la concrétisation de ce projet,

Soyez assuré de ma sincère considération

et de ma profonde gratitude.

À Benjamin,
Je te remercie pour notre amitié et tous tes précieux conseils.
Bien que l'occasion ne se soit pas présentée dans ce travail, je te remercie également
pour ta participation statistique à l'ensemble de mes travaux.

À l'ensemble des biologistes du laboratoire d'Immunologie,
Sylvain, Isabelle, Vincent, Olivier, Séverine, Anne-Sophie, Guillaume,
Par vos riches enseignements, votre disponibilité pour répondre à l'ensemble de nos
questions, vous rendez les stages au laboratoire et l'Immunologie passionnants.
Merci pour votre contribution à ma formation de biologiste spécialisé en Immunologie.

À Jacques,
Pour tes conseils avisés lors des manipulations de CSP et ton initiation à la cytométrie.

Aux techniciens du Cellulaire, Virginie, Véro L, Véro B, Manu, Maxence,
pour votre soutien dans ce travail ;
du HLA, Dominique, Pascale, en particulier, pour votre aide à la maîtrise de l'AutoMACS,
Cécile, Colette, Ève-Marie, Céline, Cédric, Liliane, Sylviane,
et de l'Humoral, Isabelle, Dominique, Sylvie, Maïté, Laure, Hélène, Sandrine, Justine,
Élisabeth, Jérôme,
À Carine, Thomas,
À Ghislaine,

Aux secrétaires du laboratoire d'Immunologie, Sylvie, Yamina et Pascale,
À vous tous, pour la convivialité que vous contribuez à faire régner au laboratoire,
permettant ainsi un travail agréable et de qualité.

Aux techniciennes du plateau de Cultures Cellulaires en Hématologie,
Véro, Marie-Pascale, et Nathalie,
pour votre dévouement sans faille dans la quête des tubes d'échantillons de CSP !

À mes parents,
Je vous remercie pour votre soutien quotidien durant l'ensemble de ce long cursus
Soyez sûrs de ma reconnaissance et de mon amour.

À mon frère, Antoine
À notre tendre complicité
Je te souhaite beaucoup de succès dans la suite de tes études et ta vie future.

À ma marraine, Cécile
Merci pour ton aide précieuse (des sujets d'arts plastiques ;) à aujourd'hui)
Merci aussi de m'avoir fait la joie d'être à mon tour marraine.

À ma petite filleule, Olympe
Je te souhaite beaucoup de bonheur.

À mes chers grands-parents,
Vous qui avez toujours crus en moi,
j'aurais tellement aimé que vous soyez présents aujourd'hui,
j'espère que vous êtes fiers de moi.

Et à tous mes oncles, tantes, cousins et cousines

À mes amies de fac, Justine et Christelle
Pour tous ces bons souvenirs sur les bancs de la fac
Pour votre soutien lors des révisions et du passage du Concours de l'Internat.

À mes amis de l'Internat, Rouennais, Stéphanie, Florian, Cédric
et Lillois, Zoë, Vassana, Guillaume G, Gauthier, Réna, Damien,
Alexandre, Guillaume D, et les autres
Je vous remercie pour tous ces bons moments passés qui ont rendu
ces 4 dernières années merveilleuses.

À mes co-internes de ce semestre, Audrey, Rébecca, Nicolas et Quentin
Pour les moments de détente mais aussi de travail dans la bonne humeur
durant ces 6 derniers mois et la réalisation de ma thèse.

À Rébecca et Benjamin (encore !), pour votre relecture attentive.

*« Tout obstacle renforce la détermination.
Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »*

Léonard de Vinci

Table des matières

Liste des Abréviations	17
I- INTRODUCTION	19
1. La greffe haploidentique	19
1.1. Indications et principe de l'allogreffe	19
1.2. Donneur compatible et notions de HLA.....	20
1.3. Définition de la greffe haploidentique	23
1.4. Place de la greffe haploidentique parmi les autres stratégies de greffe....	24
1.5. Réhabilitation et essor de la greffe haploidentique	25
1.6. Avantages et inconvénients de la greffe haploidentique	27
2. La réaction du greffon contre l'hôte, complication majeure de l'allogreffe.....	30
2.1. Définition de la GVH.....	30
2.2. Physiopathologie de la GVH aiguë.....	31
2.3. Manifestations cliniques de la GVH.....	32
3. Les stratégies de déplétion et autres stratégies d'optimisation de la greffe haploidentique	35
3.1. Composition cellulaire d'un greffon	35
3.2. Les premiers essais de déplétion des greffons haploidentiques de CSH et autres stratégies d'optimisation	37
3.3. Notre stratégie de déplétion : dépléter sélectivement les greffons haploidentiques de CSP en lymphocytes T CD4 ⁺ CCR7 ⁺	38
3.3.1. Le potentiel alloréactif des cellules T CD4 ⁺ CCR7 ⁺ et leur implication dans la GVH aiguë.....	38
3.3.2. La déplétion en lymphocytes T CD4 ⁺ CCR7 ⁺ n'interfère pas sur l'immunité anti-infectieuse acquise	40
3.3.3. Originalité de cette stratégie de déplétion.....	40
3.3.4. Stratégie de tri : conditions pratiques de réalisation	41
3.3.5. Objectifs à terme du projet de déplétion des greffons haploidentiques en lymphocytes T CD4 ⁺ CCR7 ⁺	43
II- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
1. Recueil des échantillons	44
2. Tris.....	44
2.1. Traitement de l'échantillon de CSP avant tri	44
2.2. Procédure générale du tri automatisé	45
2.3. Tri CD4	46
2.4. Tri CD8.....	47

2.5. Tri CD19	47
2.6. Tri CCR7	48
3. Évaluation de la capacité de détachement des billes des lymphocytes T CD4 ⁺ mis en culture	49
3.1. Étape de mise en culture.....	49
3.2. Évaluation du détachement des billes CD4 de la surface des lymphocytes T CD4 ⁺	49
4. Analyse immunophénotypique par cytométrie en flux et interprétation des résultats.....	50
4.1. Immunophénotypage standard et numération.....	50
4.2. Immunophénotypage des sous-populations de cellules T conventionnelles	51
4.3. Immunophénotypage explorant la viabilité des cellules	52
4.4. Immunophénotypage explorant les cellules progénitrices CD34 ⁺	52
4.5. Autres immunophénotypages.....	53
4.5.1. Analyse de l'expression du CCR7 par les différentes populations leucocytaires.....	53
4.5.2. Immunophénotypage explorant les sous-populations lymphocytaires B	53
4.6. Analyse des résultats	53
III- RÉSULTATS	55
1. Première stratégie : développement d'un double tri positif CD4 CCR7.....	55
1.1. Évaluation du tri CD4	55
1.2. Évaluation du détachement des billes magnétiques CD4	55
1.2.1. Approche standard.....	55
1.2.2. Approches pour améliorer le détachement des billes CD4	56
1.2.2.1. Réduction au demi de la concentration en billes CD4 par rapport aux recommandations fournisseur	56
1.2.2.2. Réduction au dixième et au centième de la concentration en billes CD4 par rapport aux recommandations fournisseur	57
1.2.3. Emploi d'un programme de tri plus sensible pour le tri CD4	58
1.2.4. Évaluation de la centrifugation dans le détachement des billes CD4 des lymphocytes T CD4 ⁺	60
1.3. Nouvelle stratégie pour optimiser le double tri positif CD4 CCR7 : tri simultané des lymphocytes T CD4 ⁺ CCR7 ⁺	61
1.3.1. Le tri CCR7	61
1.3.2. Choix des concentrations pour le tri simultané CD4 CCR7	63

1.3.3. Résultats du tri simultané CD4 (1/50 ^{ème}) CCR7 (1/10 ^{ème}) programme « Possel-s »	63
2. Deuxième stratégie : tri CD8 associé à un tri CCR7 sur la fraction négative ..	65
2.1. Concept	65
2.2. Évaluation du tri CD8	66
2.3. Tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8.....	66
2.3.1. Résultats du tri CCR7 aux recommandations fournisseur suite au tri CD8	66
2.3.2. Résultats du tri CCR7 au demi par rapport aux recommandations fournisseur suite au tri CD8	68
2.4. Optimisation du tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8 en vue de minimiser la perte des lymphocytes B	68
3. Stratégie retenue : deux tris successifs avec premier tri CD8-CD19 puis tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri.....	71
3.1. Évaluation des tris CD8 et CD19 simultanés	71
3.2. Le tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8-CD19	73
3.3. Caractéristiques globales du greffon après les deux étapes de tri (CD8-CD19 puis CCR7)	74
3.4. Résumé	78
IV- DISCUSSION	80
V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	91
VI- BIBLIOGRAPHIE	93
VII- ANNEXES	101

Liste des Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Adv : Adénovirus

APC : *AlloPhycoCyanin*, fluorochrome

BSA : *Bovine Serum Albumin*, Sérum Albumine Bovine

CCR7 : *Chemokine Receptor* de type 7, Récepteur de ChimioKines de type 7

CD : Cluster de Différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMN : Cellules MonoNucléées

CMV : CytoMégaloVirus

CNT : Cellules Nucléées Totales

CPAg : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSP : Cellules Souches Périphériques

DLI : *Donor Lymphocyte Infusion*, Injection de Lymphocytes du Donneur

EBV : Epstein Barr Virus

EDTA : Acide Éthylène Diamine Tétra-acétique

EFI : *European Federation for Immunogenetics*

EFS : Établissement Français du Sang

FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine

F - : fraction négative

F + : fraction positive

G : accélération de la gravité

G-CSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*, Facteur de croissance des PNN

GVH : *Graft Versus Host disease*, réaction du Greffon contre l'Hôte

GVL : *Graft Versus Leukemia*, effet du Greffon contre la Maladie

HLA : *Human Leucocyte Antigen*, CMH

ROGEAU Stéphanie

HTLV1 : Virus T-Lymphotrope Humain de type 1

IFN γ : Interféron γ

IL : InterLeukine

IP : Iodure de Propidium

J : Jour

kg : kilogramme

Ko : *Krome orange*, fluorochrome

LcT : Lymphocytes T

LPS : LipoPolySaccharide

mL : millilitre

NaCl : chlorure de sodium

NK : *Natural Killer*

PacB : *Pacific Blue*, fluorochrome

PBS : *Phosphate Buffer Saline*, Tampon Phosphate Salin

Pc pour PE-Cy : Phycoérythro-cyanine, fluorochrome

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCR-SSO : PCR *Sequence-Specific Oligonucleotide*, Oligonucléotides de Séquences Spécifiques

PCR-SSP : PCR *Sequence-Specific Primer*, Amorces de Séquences Spécifiques

Pe : Phycoérythrine, fluorochrome

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, Cellules Mononucléées du Sang Périphérique

PNN : PolyNucléaires Neutrophiles

PTLD : *Post Transplantation Lymphoproliferative Disorder*, Maladie Lymphoproliférative Post-Transplantation

RPM : *Rotation Per Minute*, Tour Par Minute

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCE : *T-Cell Epitope*, Épitope des lymphocytes T

TCR : *T-Cell Receptor*, Récepteur des Lymphocytes T

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α* , Facteur de Nécrose Tissulaire α

I- INTRODUCTION

1. La greffe haploidentique

1.1. Indications et principe de l'allogreffe

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue une immunothérapie curative utilisée dans le traitement de nombreuses hémopathies malignes (leucémies aiguës, lymphomes, syndromes myélodysplasiques...) (1,2) mais également dans le traitement des aplasies médullaires (1,3), des hémoglobinopathies (3,4) et des déficits immunitaires primitifs sévères (3,5) (Figure 1). Le rapport d'activité de l'EBMT (*European Bone Marrow Transplantation*) indique que le recours à ce traitement est en progression constante depuis 1990 avec 16 946 allogreffes de CSH réalisées en Europe en 2014 (6).

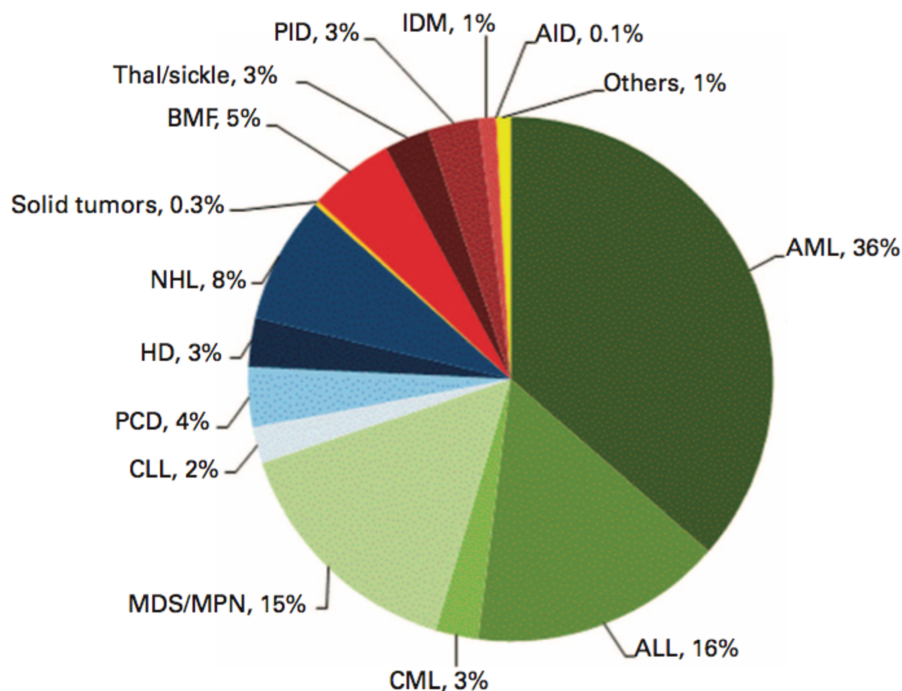


Figure 1 : Proportions des différentes indications pour allogreffe de CSH en Europe en 2014 : prédominance des hémopathies malignes (6).

(AML : Leucémie Aiguë Myéloïde, ALL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique, CML : Leucémie Myéloïde Chronique, MDS/MPN : Syndromes MyéloDysplasiques/ MyéloProlifératifs, CLL : Leucémie Lymphoïde Chronique, PCD : Plasma Cell Disorders pour Gammopathie Monoclonale, HD : Maladie de Hodgkin, NHL : Lymphome Non Hodgkinien, BMF : Bone Marrow Failure pour Aplasies Médullaires, Thal/sickle : Thalassémies et drépanocytoses, PID : Déficits Immunitaires Primitifs, IDM : Inherited Metabolic Disorders pour Maladies Métaboliques Héritées, AID : Maladies Auto-Immunes)

L'étape préalable à la greffe en elle-même correspond au conditionnement du malade qui comprend la destruction plus ou moins complète des systèmes hématopoïétique et immunitaire du patient afin de pouvoir établir un nouveau système hématopoïétique, celui du donneur. Le conditionnement va donc entraîner l'immunoincompétence du receveur facilitant ainsi la prise de greffe et évitant son rejet (1). Cette étape va également détruire les cellules leucémiques résiduelles du malade (ayant résisté aux chimiothérapies) dans le cadre d'allogreffes réalisées pour hémopathies.

Suite au conditionnement, on injecte au malade par voie intraveineuse le greffon de CSH qui peut être d'origine médullaire (lieu de résidence principal des CSH), périphérique (CSP) après injection de facteurs de croissance (G-CSF) chez le donneur et recueil par cytophérèse (1) ou, de façon moins courante aujourd'hui, issu de sang de cordon (6). La greffe va donc conduire à un chimérisme, avec l'établissement d'un système immunitaire et d'un système hématopoïétique du donneur chez le receveur. Ceci explique par conséquent le changement possible de groupe sanguin du receveur. De plus, par l'intermédiaire de l'effet GVL (*Graft Versus Leukemia*, effet du Greffon contre la Maladie), les cellules immunocompétentes du greffon vont contribuer à la destruction des cellules du clone leucémique ayant résisté au conditionnement dans les hémopathies (7). C'est pour cette raison qu'on parle d'immunothérapie curative en ce qui concerne la greffe : le malade est guéri de son hémopathie. Cependant l'allogreffe de CSH est encore aujourd'hui associée à une lourde morbi-mortalité en raison de la toxicité de la procédure (8).

1.2. Donneur compatible et notions de HLA

La compatibilité tissulaire est un point essentiel dans le cadre de l'allogreffe de CSH. Elle est supportée par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), ou système HLA (*Human Leucocyte Antigen*) chez l'Homme. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité est un complexe protéique polymorphe, découvert en 1958 par Jean Dausset (Prix Nobel de Médecine, 1980) (9) et retrouvé à la surface de toutes les cellules de l'organisme à l'exception des hématies. Les molécules du CMH servent à présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T et interviennent donc dans la réponse immunitaire adaptative et dans la défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes (10). On distingue principalement deux types de molécules du CMH qui diffèrent par leur structure, leur expression cellulaire et la nature des antigènes qu'elles présentent (*Figure 2*). On parle de CMH de classe I et de classe II.

Le CMH de classe I est exprimé sur toutes les cellules nucléées de l'organisme contrairement au CMH de classe II dont l'expression est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes B ou les macrophages. Le CMH de classe I permet la présentation d'antigènes issus du cytosol aux lymphocytes T CD8⁺ et le CMH de classe II est, quant à lui, spécialisé dans la présentation des antigènes extracellulaires aux lymphocytes T CD4⁺.

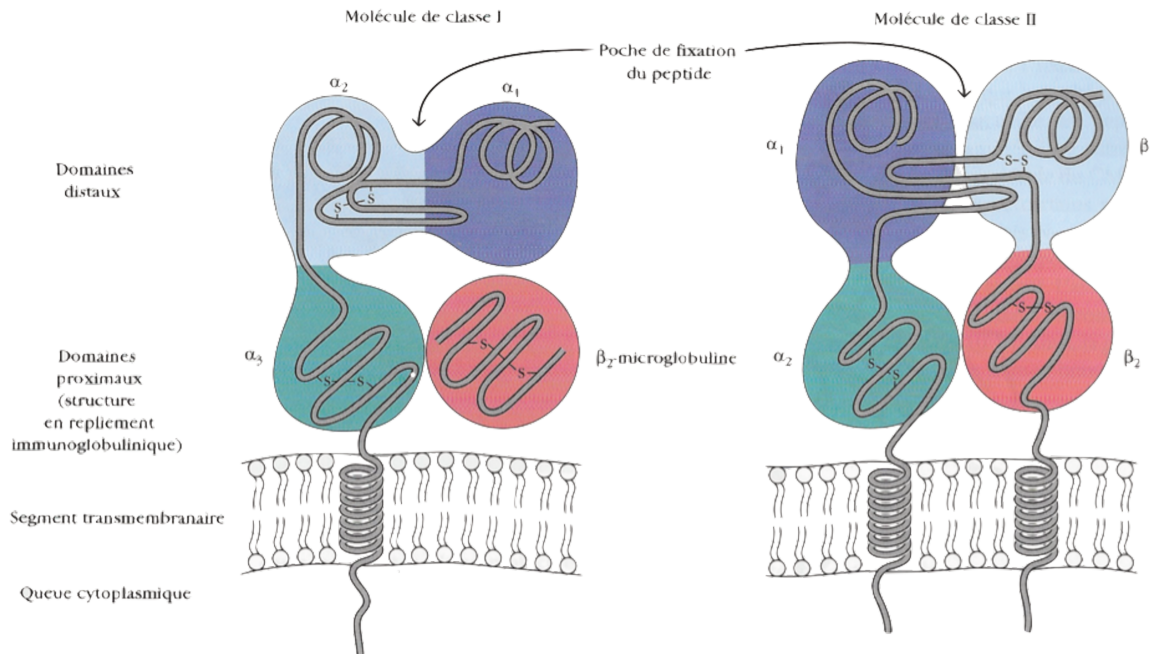


Figure 2 : Structure des molécules de CMH de classe I et de classe II (10). La molécule de CMH de classe I est constituée d'une chaîne lourde α organisée en 3 domaines (α_1 , α_2 et α_3) et associée de façon non covalente à la β_2 -microglobuline. La molécule de CMH de classe II est formée de deux chaînes polypeptidiques différentes associées de manière non covalente et chacune composée de deux domaines (α_1 et α_2 , β_1 et β_2). La poche de liaison du peptide est formée par les domaines distaux des molécules du CMH (α_1 et α_2 pour le CMH de classe I, α_1 et β_1 pour le CMH de classe II).

Avant la greffe, on détermine donc les types HLA du receveur et du donneur pour la classe I et la classe II à deux reprises sur deux échantillons de sang différents par deux techniques différentes dans un laboratoire HLA accrédité EFI. Pour la greffe de CSH, il est nécessaire de déterminer le typage allélique, appelé typage haute résolution de chaque locus (Figure 3). On utilise pour cela des techniques de biologie moléculaire (PCR-SSP, -SSO, séquençage...) (11,12). Le typage des antigènes de classe I peut également être déterminé en sérologie cependant cela n'est pas suffisant pour la greffe de CSH puisque cette technique ne permet qu'un typage basse résolution. Les techniques sérologiques peuvent permettre de lever les ambiguïtés avec des allèles nuls. Pour la classe I, on

détermine les allèles HLA-A, -B, -C et pour la classe II, classiquement les allèles HLA-DR et -DQ.

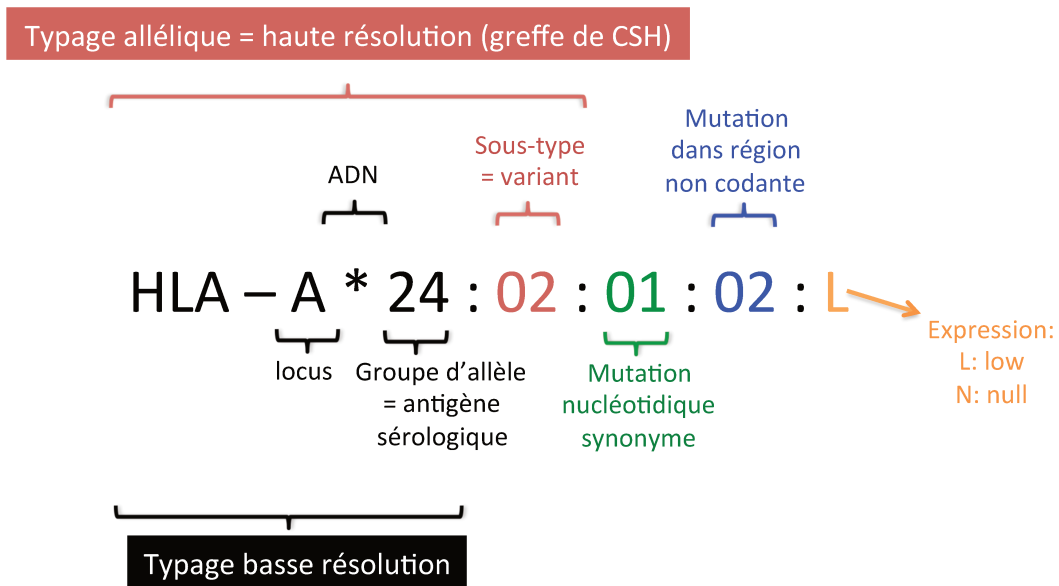


Figure 3 : Exemple de la dénomination d'une molécule HLA après typage en biologie moléculaire selon la nomenclature OMS 2010.

Chaque individu possède pour chaque locus HLA un allèle provenant de son père et un allèle provenant de sa mère. Ces deux allèles étant co-exprimés à la surface des cellules, on parle d'expression codominante (10). De ce fait, pour trouver un donneur HLA-compatible pour un receveur, on prend en compte en Europe 10 molécules HLA, et si donneur et receveur sont identiques pour ces 10 molécules, on parle de donneur HLA-compatible 10/10 ou HLA-identique 10/10 (13). Aux États-Unis, on ne s'intéresse en greffe de CSH qu'à 4 loci HLA : HLA-A, -B, -C et -DR. On parle alors de donneur HLA-compatible 8/8 en cas d'identité parfaite entre donneur et receveur pour ces 8 allèles (14).

Quand on a en plus une compatibilité pour le locus HLA-DP (molécule de classe II), on parle même de donneur HLA-compatible 12/12. En présence d'un *mismatch* pour le locus DP entre donneur et receveur, celui-ci peut être classifié en *mismatch* permissif (toléré), non permissif dans le sens GVH (*Graft Versus Host*) ou non permissif dans le sens HVG (*Host versus Graft*) grâce au modèle TCE (*T-Cell Epitope*) basé sur l'immunogénicité des épitopes des lymphocytes T alloréactifs défini par Fleischhauer et son équipe (15,16). Malgré des données contradictoires dans la littérature, il semble qu'un *mismatch* DP non permissif dans le sens GVH conduise à un risque plus élevé de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) aiguë

sévère et qu'un *mismatch* non permissif dans le sens HVG soit associé à un risque plus élevé de rechute (17).

1.3. Définition de la greffe haploidentique

Les gènes du HLA sont regroupés au sein d'une même zone du génome, au niveau du bras court du chromosome 6 (*Figure 4*). Ainsi étroitement liés, ces gènes sont transmis en bloc à la descendance. On parle alors d'haplotype pour chaque groupe d'allèles. Un haplotype est composé d'un allèle HLA-A, un allèle HLA-B, un allèle HLA-C, un allèle HLA-DR, un allèle HLA-DQ et un allèle HLA-DP. Chaque individu possède deux haplotypes : un hérité de son père (haplotype paternel) et l'autre de sa mère (haplotype maternel) (10).

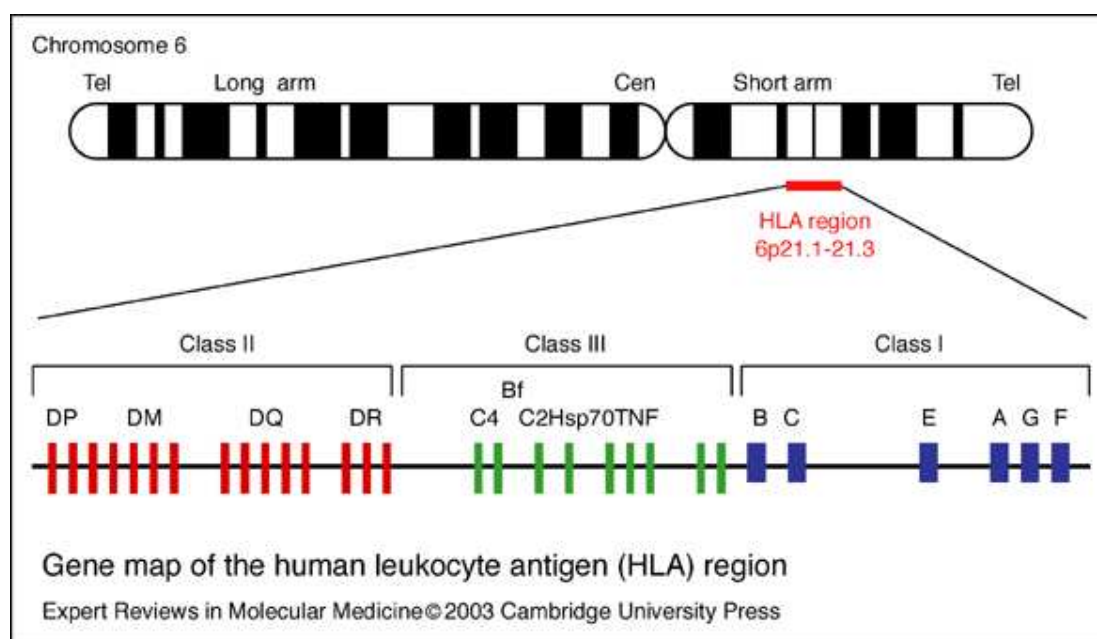


Figure 4 : Carte génomique simplifiée du CMH humain sur le chromosome 6. Les gènes du CMH de classe I sont écrits en bleu et ceux de classe II en rouge. Les gènes du CMH de classe III, écrits en vert ne sont pas pris en compte en transplantation à l'heure actuelle.

L'allogreffe haploidentique correspond à une semi-compatibilité HLA entre donneur et receveur (équivalent d'une compatibilité 5/10). Elle consiste à sélectionner un donneur au sein des membres de la famille possédant un haplotype HLA en commun avec le receveur (18). Elle permet ainsi d'élargir considérablement le nombre de donneurs pour un candidat à l'allogreffe : les parents, 3/4 de la fratrie et les enfants d'un patient sont en principe haploidentiques au malade (*Figure 5*).

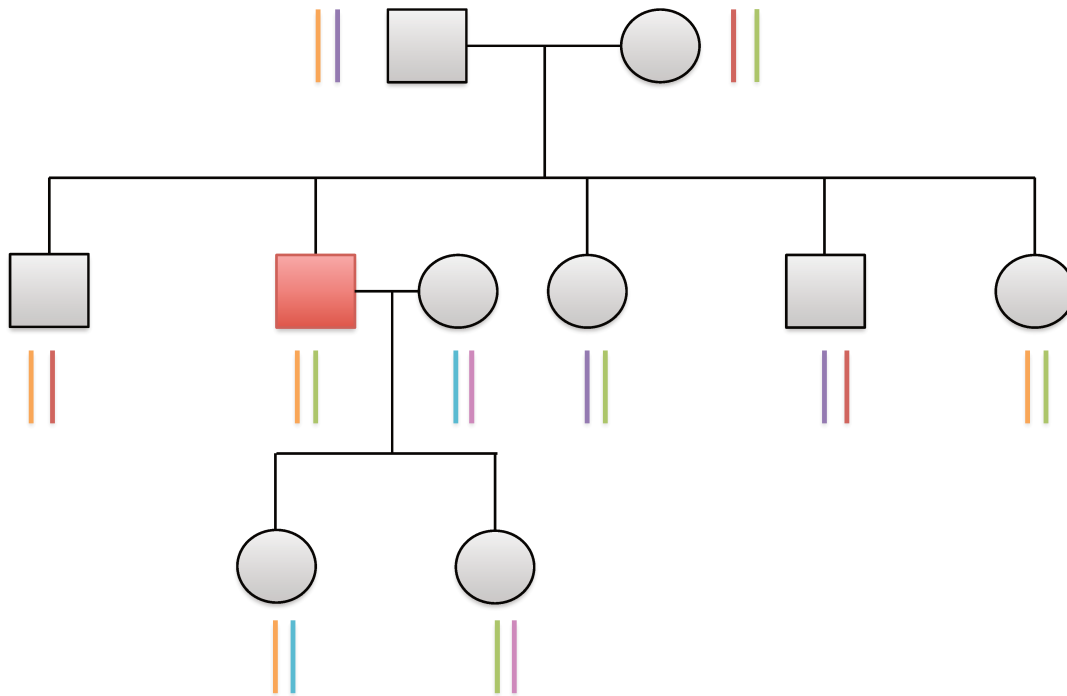


Figure 5 : Arbre généalogique représentant la transmission des haplotypes HLA. Un haplotype HLA est représenté par une ligne verticale. L'individu malade en attente d'allogreffe est l'homme en rouge : ainsi chacun de ses parents et de ses enfants possède un haplotype en commun avec lui et 3 de ses 4 frères et sœurs possèdent au moins un haplotype en commun avec lui (parmi lesquels une sœur génocidente : 2 haplotypes HLA en commun).

1.4. Place de la greffe haploidentique parmi les autres stratégies de greffe

Lorsque l'on veut greffer un malade, le *gold standard* repose sur l'existence d'un donneur HLA-compatible 10/10 recherché d'abord au sein de la fratrie. Cependant, comme vu précédemment, un malade a seulement 1 chance sur 4 d'avoir un frère ou une sœur HLA-compatible 10/10 (Figure 5). En l'absence de donneur apparenté HLA-compatible, l'alternative est de réaliser une interrogation des fichiers nationaux et internationaux de donneurs volontaires pour trouver un donneur HLA-compatible non apparenté (13,19). Malgré tout, près de la moitié des candidats à l'allogreffe n'ont pas de donneur HLA-compatible 10/10 que ce soit dans la fratrie ou dans les fichiers de donneurs volontaires (20).

Lorsqu'aucun donneur HLA-compatible 10/10 apparenté ou non apparenté n'est trouvé, plusieurs stratégies sont alors envisageables : (i) le choix d'un donneur non apparenté présentant un *mismatch* HLA (donneur 9/10), (ii) un donneur familial haploidentique, (iii) une greffe de sang de cordon. Aucune de ces stratégies n'est prioritaire puisque toutes trois présentent des performances différentes en matière de prise de greffe, de GVH, de rechute et de survie globale (21) et aucune n'est optimale sur toutes les conditions.

1.5. Réhabilitation et essor de la greffe haploidentique

Le recours à un donneur familial haploidentique émerge dans les années 80. Les premiers essais se révèlent rapidement décevants en raison des difficultés rencontrées pour maîtriser la réaction alloréactive bidirectionnelle majeure liée à cette semi-compatibilité HLA entre donneur et receveur. Associés à des incidences élevées de GVH sévère et de rejet, ils génèrent une morbi-mortalité rédhibitoire chez les receveurs (22,23). Pour pallier ce problème, des stratégies de déplétion totale des greffons haploidentiques en lymphocytes T associées à un conditionnement myéloablatif du receveur se sont développées dans les années 90. Cependant cette pratique s'est compliquée d'une reconstitution immunitaire lente associée à une susceptibilité accrue aux infections opportunistes sévères, principalement fongiques et virales, et à des taux de rechute de la maladie initiale plus élevés (24).

La pratique de la greffe haploidentique n'est réhabilitée que depuis une petite dizaine d'années avec la modification du conditionnement et du traitement immunosuppresseur post-greffe. Deux grandes stratégies sont développées. L'équipe de Pékin recourt à l'utilisation de sérum anti-lymphocytaire (SAL) dans le conditionnement pré-greffe des receveurs associé à un greffon médullaire prélevé chez un donneur ayant reçu du G-CSF (25,26). L'équipe de Séoul fait de même mais avec un greffon de CSP (27). En parallèle, l'équipe de John Hopkins à Baltimore développe la greffe haploidentique grâce à l'emploi d'un greffon de moelle non manipulé et à l'administration de fortes doses de cyclophosphamide (Endoxan®) à J3 et J4 post-greffe (*Figure 6*). Cette dernière stratégie a pour but d'éliminer immédiatement après la greffe les lymphocytes réactifs du greffon (28,29) et ainsi maîtriser l'alloréactivité majeure de ce type de greffe. En effet le principe actif qui découle du métabolisme du cyclophosphamide est un agent alkylant particulièrement produit dans les cellules ayant un faible taux d'ALDH (enzyme aldéhyde déshydrogénase), et notamment les lymphocytes activés (30). Ainsi le cyclophosphamide administré à J3 et J4 post-greffe permet une déplétion des lymphocytes alloréactifs activés (*Figure 7*) alors que les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes B mémoires et T anti-infectieux, les épithéliums hépatiques et intestinaux sont relativement préservés de la toxicité de la molécule (30,31). Ces deux grandes stratégies ont en commun une réduction significative du risque de GVH et donc une diminution majeure de la morbi-mortalité liée à la greffe haploidentique. De plus, l'approche de John Hopkins, celle présentant le plus de recul, est reproduite par différentes équipes dans le monde avec des résultats

semblables sur un nombre conséquent de patients (32), y compris des receveurs âgés (33). Bashey *et al.*, en 2013, dans une étude rétrospective, avancent même que la greffe haploidentique encadrée par le protocole de Baltimore, présente des performances équivalentes à la greffe HLA-compatible apparentée ou non apparentée (34).

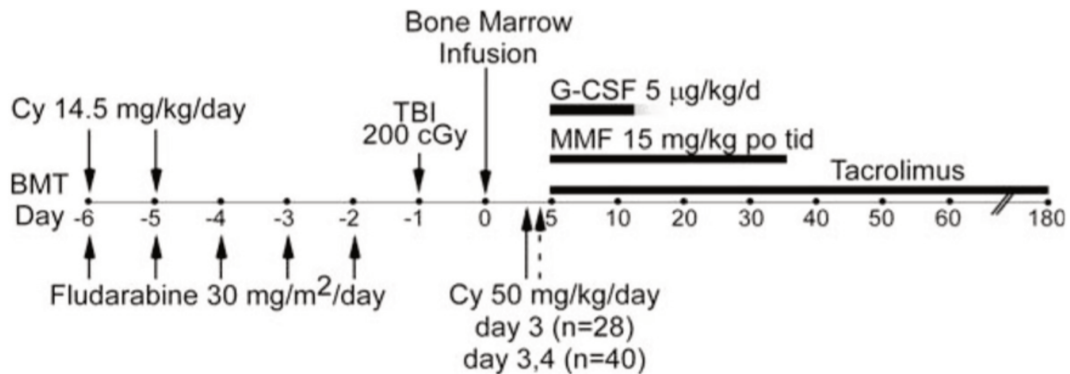


Figure 6 : Schéma de la stratégie de conditionnement et de traitement immunosuppresseur post-greffe associée à la greffe haploidentique proposée par l'équipe de Baltimore (29).

(BMT : Bone Marrow Transplantation pour greffe de moelle osseuse, Cy : cyclophosphamide, TBI : Total Body Irradiation pour irradiation corporelle totale, Bone Marrow Infusion pour injection de moelle osseuse, G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor pour facteur de croissance des PNN, MMF : Mycophenolate Mofetil)

Cette stratégie associe un conditionnement non myéloablatif comprenant de la fludarabine, une irradiation corporelle totale, un greffon de moelle osseuse et une prévention de la GVH par injection post-greffe de cyclophosphamide à J3 et J4 et d'autres traitements immunosuppresseurs tels que le Tacrolimus et le Mycophenolate Mofetil.

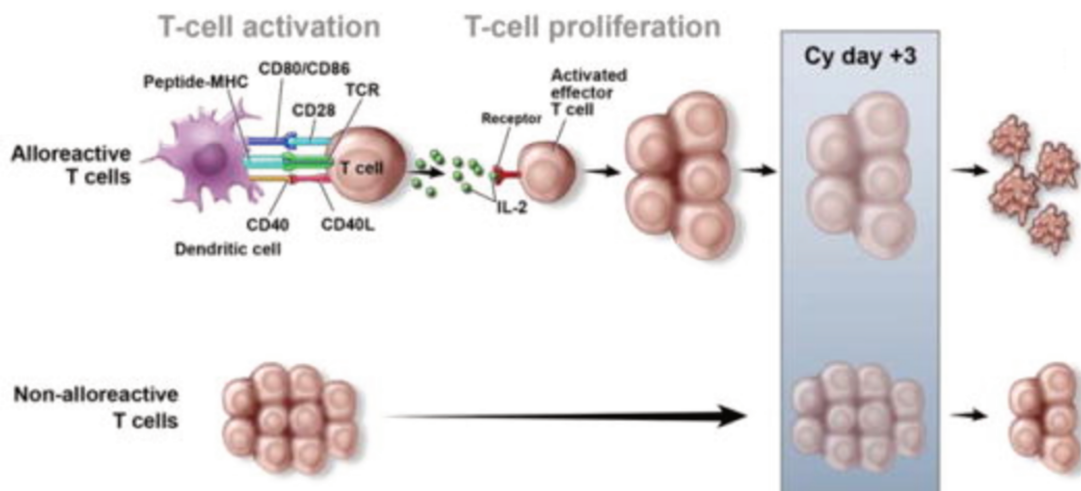


Figure 7 : Mécanisme proposé pour l'induction de la tolérance associée à l'injection de fortes doses de cyclophosphamide post-greffe. En haut, les lymphocytes T alloreactifs reconnaissent les alloantigènes présentés par les cellules dendritiques conduisant ainsi à l'activation et à la prolifération des cellules T. Les cellules T alloreactives qui ont proliféré sont détruites par le cyclophosphamide injecté à J3, agent alkylant spécifique de la phase S du cycle cellulaire. En bas, les cellules non alloreactives restent quiescentes et ne sont donc pas détruites par le cyclophosphamide à haute dose (29).

Ainsi malgré le fait qu'elle constitue encore aujourd'hui une stratégie de deuxième intention au même titre qu'un donneur non apparenté avec *mismatch* ou qu'une greffe de sang de cordon, la greffe haploidentique, très prometteuse, connaît un essor indéniable ces dernières années (*Figure 8*) avec une croissance annuelle médiane de 25% de son utilisation en Europe entre 2011 et 2014 contre une croissance annuelle médiane de 2% entre 2004 et 2010 (6).

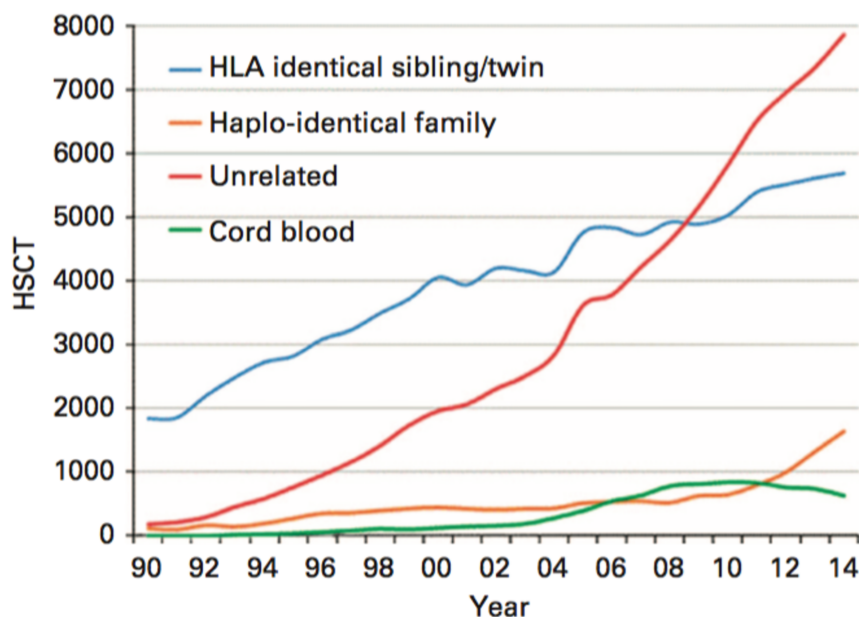


Figure 8 : Nombres absolus de greffes de CSH à partir d'un donneur HLA-compatible issu de la fratrie (en bleu), un donneur non apparenté (en rouge), un sang de cordon (en vert) et un donneur familial haploidentique (en orange) réalisées en Europe entre 1990 et 2014 (6).

À Lille, le recours à la greffe haploidentique est très récent et en pleine expansion depuis environ 2 ans avec 9 allogreffes haploidentiques réalisées en 2014 pour un total de 108 allogreffes sur l'année (soit 8,3% des allogreffes) et 17 allogreffes haploidentiques en 2015 pour un total de 95 allogreffes sur l'année (soit 17,9% des allogreffes) (données du service de Maladies du Sang, Hôpital Huriez, CHRU de Lille).

1.6. Avantages et inconvénients de la greffe haploidentique

La réhabilitation récente de la greffe haploidentique rend cette stratégie très attractive car elle dispose de nombreux avantages (35) expliquant son essor considérable. En effet, elle augmente le nombre de donneurs potentiels et la probabilité de trouver un donneur pour un candidat à l'allogreffe dans un délai relativement réduit (20) et à moindre coût (36,37), par rapport à une interrogation de fichiers recherchant un donneur non apparenté. De plus, le recours à un donneur

familial dans la greffe haploidentique permet l'accès aux stratégies post-greffe, telles que l'injection de lymphocytes immunocompétents du donneur (DLI) au receveur (38). D'autre part, la greffe haploidentique utilisée aujourd'hui avec le protocole de Baltimore génère moins de GVH aiguë ou chronique que les autres types de greffes. En effet dans son étude réalisée sur 459 patients ayant subi une allogreffe entre 2006 et 2012, Raiola *et al.* montrent que l'incidence cumulée de GVH aiguë de grade II à IV est significativement plus faible (14%) chez les receveurs de greffons haploidentiques par rapport aux autres types de greffés (31% dans la greffe apparentée 10/10, 21% dans la greffe non apparentée 10/10, 42% dans la greffe non apparentée avec un *mismatch* et 19% dans la greffe de cordon) (39). De même, l'incidence cumulée de GVH chronique modérée à sévère a tendance à être plus faible chez les greffés haploidentiques (*Figure 9*). La greffe haploidentique permet aussi une reconstitution hématologique post-greffe plus rapide qu'en cas d'utilisation de sang de cordon (21). La greffe haploidentique se révèle même être la meilleure stratégie en matière de survie sans progression de la maladie dans certaines indications telles que le lymphome de Hodgkin (36,40). Ainsi la greffe haploidentique se positionne aujourd'hui comme une véritable alternative en l'absence de donneur apparenté (38).

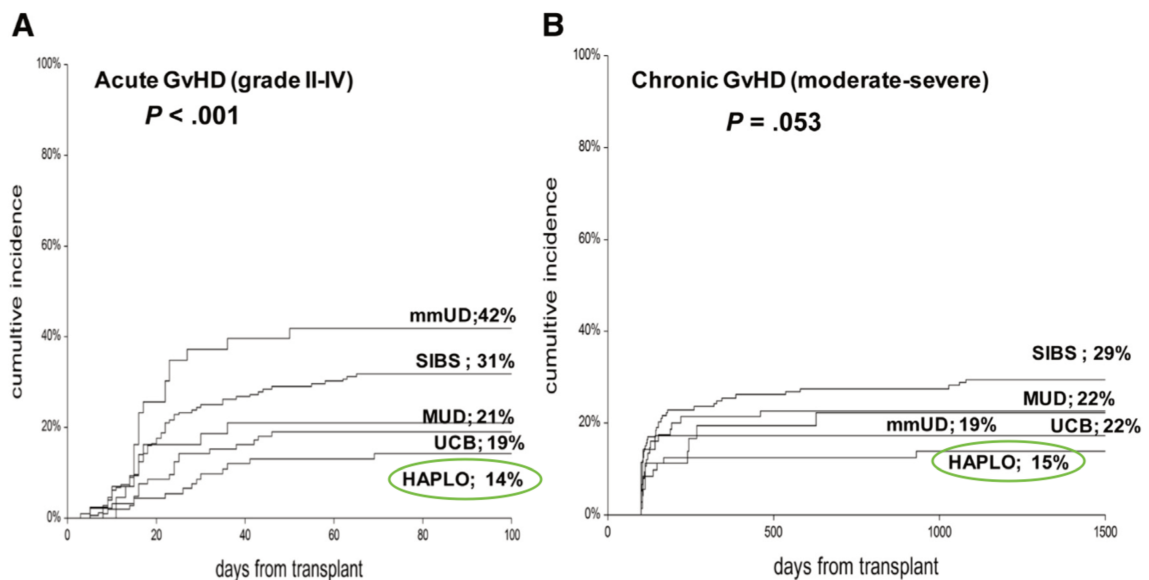


Figure 9 : (A) Incidence cumulée de GVH aiguë de grade II à IV. (B) Incidence cumulée de GVH chronique modérée à sévère (39).

(mmUD : mismatched unrelated donors, donneurs non apparentés avec mismatch, SIBS : siblings, donneurs HLA-compatibles dans la fratrie, MUD : matched unrelated donors, donneurs HLA-compatibles non apparentés, UCB : unrelated cord blood, greffes de sang de cordon, HAPLO : haploidentical family donors, donneurs familiaux haploidentiques)

Cependant, des inconvénients demeurent (35). Le corollaire de la faible incidence de GVH aiguë et chronique est le taux de rechute plus élevé associé à la greffe haploidentique (*Figure 10*) par rapport aux greffes non apparentées avec ou sans *mismatch* et à la greffe de sang de cordon (39,41), bien que celui-ci soit impacté par le statut de la maladie au moment de la greffe (37).

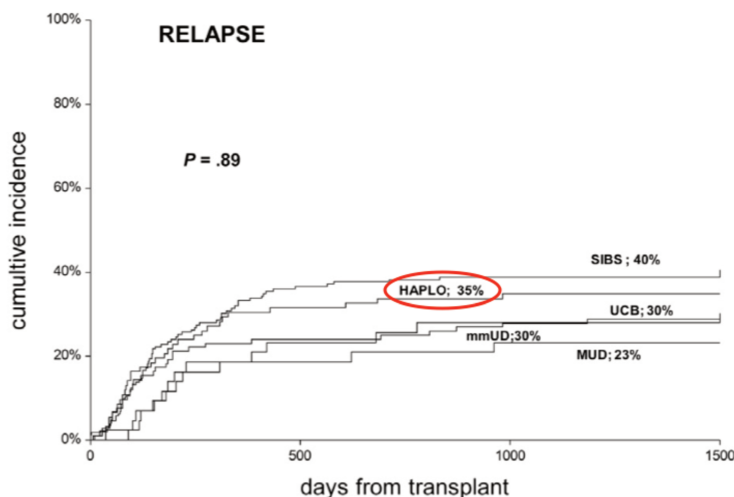


Figure 10 : Incidence cumulée de rechute post-greffe en fonction du type de greffon (39).

(*mmUD* : mismatched unrelated donors, donneurs non apparentés avec mismatch, *SIBS* : siblings, donneurs HLA-compatibles dans la fratrie, *MUD* : matched unrelated donors, donneurs HLA-compatibles non apparentés, *UCB* : unrelated cord blood, greffes de sang de cordon, *HAPLO* : haploidentical family donors, donneurs familiaux haploidentiques)

De plus, l'emploi de cyclophosphamide en post-greffe rend la greffe haploidentique non envisageable chez tous les patients et particulièrement ceux présentant déjà des comorbidités. En effet, cette molécule est responsable d'une toxicité cardiaque majeure (42) et notamment de quelques cas de morts subites, mais également de cystites hémorragiques à BK virus (42,43) et d'infections. Enfin, en cas de greffe haploidentique, il est indispensable de rechercher chez le receveur les éventuels anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur. La présence chez le receveur de tels anticorps dirigés contre les molécules HLA de l'haplotype incompatible peut être un obstacle à la réalisation de la greffe haploidentique. En effet, cette situation est associée à un risque élevé de rejet du greffon chez le receveur (44). Par conséquent ce type de donneur doit être écarté (32), ce qui peut parfois compromettre le projet de greffe quand, par exemple, une mère s'est immunisée contre le ou les haplotypes paternels de ses enfants lors de ses grossesses.

Ainsi, si l'accès à ce type de greffe est aujourd'hui porteur de nombreux espoirs, beaucoup de progrès restent à accomplir pour mieux comprendre et maîtriser l'alloréactivité dans ce contexte.

2. La réaction du greffon contre l'hôte, complication majeure de l'allogreffe

2.1. Définition de la GVH

La principale complication de l'allogreffe de CSH, et notamment en cas d'allogreffe haploidentique est un désordre immunologique appelé réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Elle exige trois conditions pour se développer : (i) le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes, (ii) le receveur doit exprimer des alloantigènes tissulaires absents chez le donneur, (iii) et le receveur doit être immunodéprimé et incapable de développer une réponse immunitaire efficace pour éliminer les cellules du greffon (45). Les cellules immunocompétentes impliquées dans ce mécanisme sont avant tout les lymphocytes T du donneur. Il s'agit donc d'une maladie inflammatoire médiée par les cellules T (46). Les cellules dendritiques du receveur vont présenter les alloantigènes aux lymphocytes T du donneur conduisant ainsi à une réaction alloréactive. Dans la greffe haploidentique, la source principale d'alloantigènes correspond aux *mismatch* au niveau des antigènes majeurs du système d'histocompatibilité (molécules HLA) et donc à l'haplotype qui diffère. La fréquence de la GVH est directement liée au degré de *mismatch* entre les molécules HLA (47). C'est pour cette raison que dans la greffe haploidentique sans prise en charge spécifique la GVH est constante et majeure. Cependant même en cas d'identité HLA parfaite entre le donneur et le receveur (greffe HLA-compatible 10/10), la GVH peut survenir de façon imprévisible : environ 40% à 60% des receveurs de greffons HLA-compatibles 10/10 développent une GVH systémique aiguë nécessitant un traitement (48,49). Ceci est dû aux différences génétiques entre donneur et receveur qui codent pour les antigènes mineurs du système d'histocompatibilité (50).

La GVH peut survenir sous deux formes : la GVH aiguë et la GVH chronique. La GVH aiguë survient classiquement dans les 100 premiers jours suivant la greffe alors que la GVH chronique est plus tardive (46). Ces deux formes constituent des entités bien distinctes associées à des étiologies et physiopathologies différentes. Cependant la physiopathologie de la GVH chronique demeure moins bien connue. Cette définition et ce seuil de 100 jours restent théoriques puisqu'on sait que des

signes de GVH aiguë peuvent survenir au delà de J100, notamment en cas de conditionnement atténué chez le receveur (48) et que des manifestations de GVH chronique peuvent coexister avec des manifestations de GVH aiguë avant J100 (51).

2.2. Physiopathologie de la GVH aiguë

Comme le proposent Ferrara *et al.* (48), la physiopathologie de la GVH aiguë se décompose en trois phases successives décrites ci-dessous (*Figure 11*) :

- 1^{ère} phase : le conditionnement du receveur en vue de sa préparation à la greffe et les traitements de la maladie sous-jacente induisent des dommages tissulaires et le relargage d'un orage cytokinique proinflammatoire (TNF α , IL1, IL6), lui-même responsable de l'activation et de la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) du receveur. Les dommages tissulaires au niveau du tractus gastro-intestinal de l'hôte amplifient ce mécanisme par la translocation systémique de *stimuli* inflammatoires additionnels, tels que des produits bactériens comme le LPS (lipopolysaccharide) issus de la flore intestinale, contribuant eux aussi à l'activation des CPAg de l'hôte (52,53).
- 2^{ème} phase : dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T du donneur reconnaissent les alloantigènes présentés par les CPAg du receveur par l'intermédiaire de récepteurs T (TCR, *T Cell Receptor*). Leur activation est complétée par l'engagement de molécules de costimulation présentes à leur surface. Cela va conduire à la prolifération et la différenciation de lymphocytes T alloréactifs du donneur, acteurs clés de la réaction de GVH aiguë.
- 3^{ème} phase : il s'agit d'une cascade complexe associant des médiateurs cellulaires (lymphocytes T cytotoxiques, lymphocytes NK) et des agents inflammatoires solubles (TNF α , IFN γ , IL1, acide nitrique). Les lymphocytes T alloréactifs vont migrer au niveau des tissus cibles de la GVH, porteurs d'antigènes mineurs ubiquitaires, et vont recruter d'autres médiateurs cellulaires conduisant à la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires. De façon synergique, ces molécules vont conduire à la destruction des tissus cibles de la GVH entraînant une augmentation des signaux proinflammatoires, amplifiant ainsi le processus de la maladie et contribuant à son auto-entretien (46,48,54).

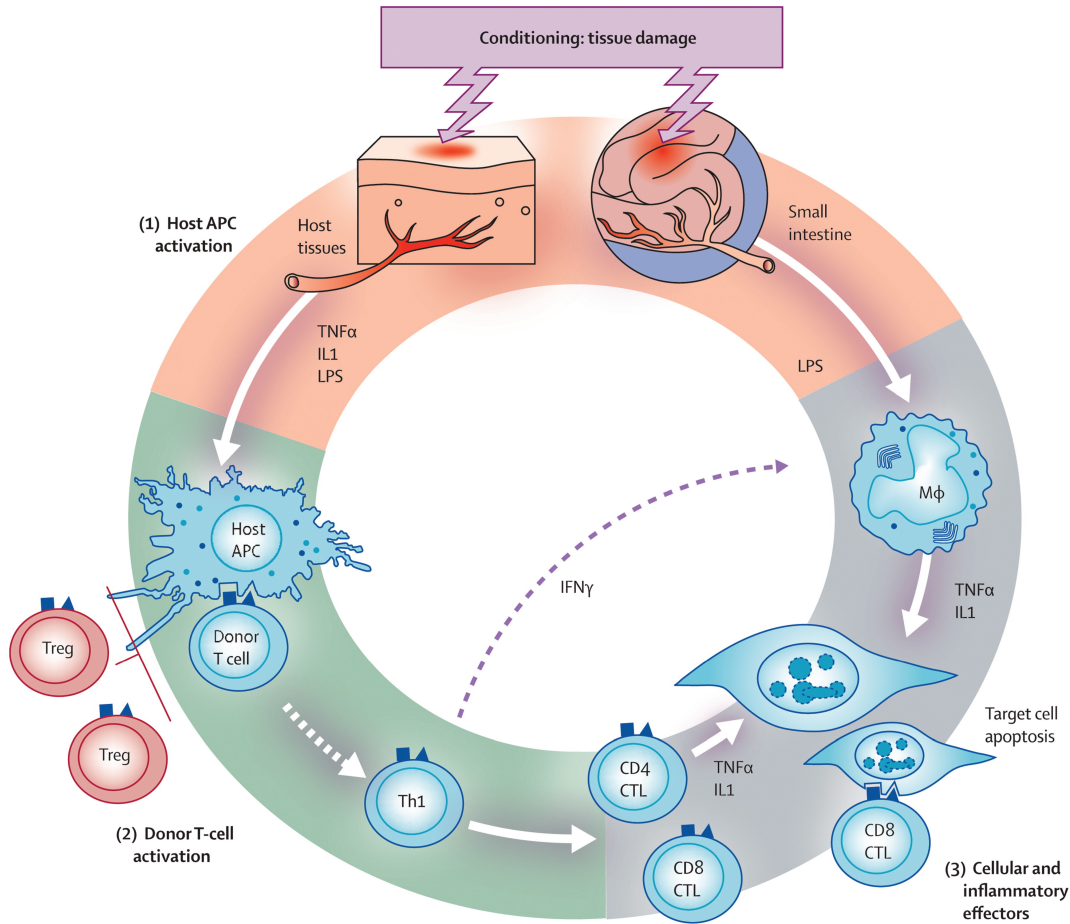


Figure 11 : Physiopathologie de la GVH aiguë (48).

(APC : Cellules Présentatrices d'Antigènes, TNFα : Tumor Necrosis Factor α, IL1 : Interleukine 1, LPS : Lipopolysaccharide, IFNγ : Interféron γ, Treg : Lymphocytes T régulateurs, CTL : Lymphocytes T cytotoxiques)

(1) Activation des CPAg du receveur, (2) Activation et prolifération des lymphocytes T du donneur, (3) Destruction des tissus cibles.

2.3. Manifestations cliniques de la GVH

Dans la GVH aiguë, les principaux organes cibles sont la peau, le tube digestif et le foie (Figure 12).

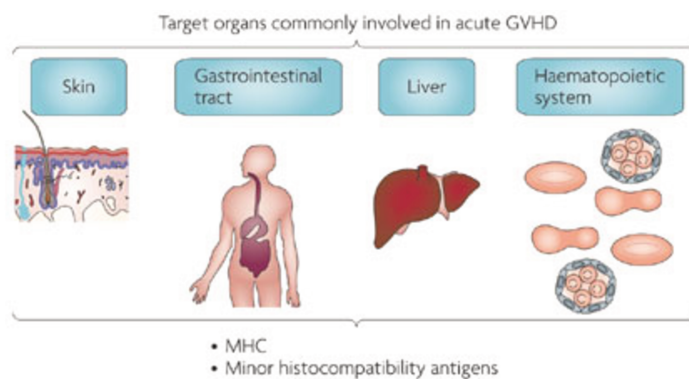


Figure 12 : Organes cibles de la GVH aiguë (54).

La peau constitue l'organe le plus fréquemment et le plus rapidement atteint lors d'une réaction aiguë de GVH. La principale manifestation est un rash maculopapuleux prurigineux qui peut toucher l'ensemble du corps. Dans les formes les plus graves peuvent apparaître des décollements cutanés au pronostic souvent péjoratif (55). L'atteinte digestive se manifeste généralement par des diarrhées, douleurs abdominales, nausées, vomissements et anorexie (48,55). Enfin, l'atteinte hépatique, rarement isolée, se caractérise par des perturbations biologiques associées à une cholestase et plus rarement une cytolyse (56).

En raison de la gravité variable des atteintes tissulaires, Glücksberg a proposé une classification en stades de gravité de 1 à 4 pour chaque atteinte d'organe (*Tableau 1*) permettant ainsi de définir des grades de GVH aiguë allant de I à IV (I : légère, II : modérée, III : sévère et IV : très sévère) (*Tableau 2*) (57). Cette classification est utilisée à des fins pronostiques pour estimer la survie.

Stade	Peau	Foie	Tube digestif
0	Absence de rash	Bilirubine < 2 mg/dL	Diarrhée < 500 mL/j ou nausées persistantes
1	Rash maculo-papuleux < 25% de la surface corporelle	2-3 mg/dL	Diarrhée entre 500 et 1000 mL/j ou nausées persistantes, vomissements ou anorexie avec biopsie positive
2	Rash maculo-papuleux entre 25% et 50% de la surface corporelle	3-6 mg/dL	Diarrhée entre 1000 et 1500 mL/j
3	Rash maculo-papuleux > 50% de la surface	6-15 mg/dL	Diarrhée > 1500 mL/j
4	Érythrodermie généralisée avec formation bulleuse	> 15 mg/dL	Douleurs abdominales sévères avec ou sans iléus

Tableau 1 : Classification de Glücksberg des stades de gravité des organes cibles touchés par la GVH aiguë (57).

Grade	Peau	Foie	Tube digestif
I	Stades 1-2	0	0
II	Stades 1-3 ou	Stade 1 ou	Stade 1
III	Stades 2-3 ou	Stades 2-3 ou	Stades 2-3
IV	Stades 2-4 ou	Stades 2-4 ou	Stades 2-4

Tableau 2 : Classification de Glücksberg des grades de GVH aiguë en fonction de l'altération des organes cibles touchés (57).

La GVH aiguë dans ses formes les plus sévères peut mettre en jeu le pronostic vital avec une survie à 5 ans estimée à 25% pour une GVH aiguë de grade III et 5% pour une GVH aiguë de grade IV (58).

La GVH chronique peut être l'évolution d'une GVH aiguë ou apparaître *de novo*. Elle est très polymorphe, peut toucher tous les organes et tissus (peau, tube digestif, foie comme la GVH aiguë, mais aussi poumons, reins, cœur, moelle osseuse, muscles, muqueuses buccale, oculaire et génitale...) et s'apparente dans sa symptomatologie à un syndrome auto-immun (48). Les principaux facteurs de risque de GVH chronique sont un âge avancé et une histoire antérieure de GVH aiguë (59). Sa classification distingue principalement les formes limitées des formes extensives (51).

En cas de GVH aiguë modérée à sévère, le traitement de référence repose sur une corticothérapie systémique à haute dose (48). Dans la GVH chronique le traitement de référence consiste en une corticothérapie orale plus ou moins associée à de la ciclosporine (60). On a recours aujourd'hui en seconde ligne à la photophérèse extracorporelle pour traiter la GVH chronique (61,62).

Ainsi dans la perspective de réduire la réaction de GVH aiguë tout en préservant l'effet de l'immunothérapie, plusieurs équipes ont développé de nouveaux concepts thérapeutiques et différentes stratégies innovantes, appliqués notamment dans le domaine de la greffe haploidentique.

3. Les stratégies de déplétion et autres stratégies d'optimisation de la greffe haploidentique

3.1. Composition cellulaire d'un greffon

La composition d'un greffon de CSH diffère d'un donneur à un autre. On retrouve bien sûr des cellules progénitrices caractérisées par leur marqueur de surface CD34⁺ et indispensables à la génération d'une nouvelle hématopoïèse chez le receveur. Leur quantité diffère grandement en fonction de la source du greffon : un greffon de moelle osseuse étant en général approximativement cinq à dix fois moins riche en cellules CD34⁺ qu'un greffon de cellules souches périphériques (63). Quelle que soit la nature du greffon, les CSH ne représentent que quelques pourcents des cellules greffées. Les autres cellules constituent différentes catégories de cellules immunocompétentes.

Les principales populations lymphocytaires retrouvées au sein d'un greffon sont identiques à celles du sang circulant : on retrouve les lymphocytes T, caractérisés par leur marqueur de surface CD3⁺, les lymphocytes B, CD19⁺ et les lymphocytes NK CD3⁻, CD16⁺ et/ou CD56⁺. Néanmoins il faut savoir qu'un greffon de CSP contient environ dix fois plus de lymphocytes T et B qu'un greffon de moelle osseuse (64,65).

Au sein même des lymphocytes T, on distingue différentes sous-populations qu'on peut identifier par leur structure ou leurs fonctions : les lymphocytes T $\alpha\beta$ et les lymphocytes T $\gamma\delta$ qui diffèrent par la structure de leur récepteur TCR. Au sein des lymphocytes T $\alpha\beta$, les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ sont eux-mêmes divisés en sous-populations selon leur stade de différenciation post-stimulation antigénique. En effet, on identifie les lymphocytes naïfs (N) n'ayant pas encore été activés dans le compartiment lymphocytaire périphérique. Ils expriment fortement une L-sélectine CD62L et un récepteur de chimiokines CCR7, cruciaux pour la migration lymphocytaire dans les organes lymphoïdes secondaires ainsi que le marqueur CD45RA (66). Les sous-populations lymphocytaires T mémoires sont celles préservées au décours d'une stimulation antigénique. Elles sont hétérogènes dans leur expression phénotypique des marqueurs de surface : il existe les lymphocytes centraux mémoires (CM), CD45RA⁻ CCR7⁺ CD62L⁺, les lymphocytes mémoires effecteurs (EM), CD45RA⁻ CCR7⁻ CD62L⁽⁺⁾⁻ et les lymphocytes au stade terminal de différenciation (TD), CD45RA⁺ CCR7⁻ CD62L⁽⁺⁾⁻ (Figure 13) (66). Ainsi le marqueur de surface CCR7 permet une meilleure distinction des différentes

sous-populations mémoires que CD62L (67). Parmi les lymphocytes T CD4⁺, prédominent majoritairement les sous-populations naïves et centrales mémoires alors que parmi les lymphocytes T CD8⁺, les cellules mémoires sont principalement CCR7⁻. Cependant, l'équilibre entre ces différentes catégories de cellules T mémoires diffère grandement d'un individu à l'autre (66) selon son âge et son passé immunitaire.

À côté des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels, on distingue les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs, caractérisés par le phénotype CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ CD127^{low}. Ces cellules, présentes au sein du greffon, sont susceptibles de moduler l'alloréactivité post-greffe. Des études montrent leur rôle sur la régulation du mécanisme de GVH (68).

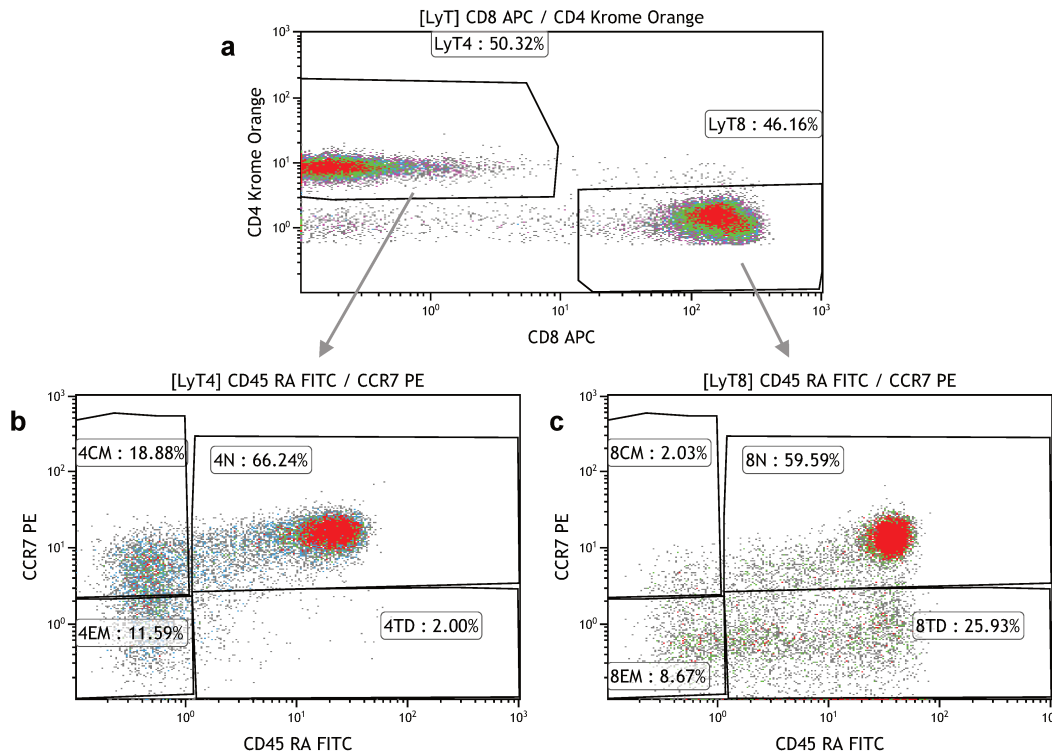


Figure 13 : Immunophénotypage lymphocytaire permettant de distinguer les différentes sous-populations lymphocytaires T en cytométrie en flux sur un échantillon de CSP. (a) Distinction des deux populations lymphocytaires T : T CD4⁺ et T CD8⁺ par l'intermédiaire de leurs marqueurs de surface. (b) Représentation des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ : naïves (4N), centrales mémoires (4CM), mémoires effectrices (4EM) et au stade terminal de différenciation (4TD) grâce aux marqueurs de surface CCR7 et CD45RA. (c) Représentation des différentes sous-populations lymphocytaires T CD8⁺ : naïves (8N), centrales mémoires (8CM), mémoires effectrices (8EM) et au stade terminal de différenciation (8TD) grâce aux marqueurs de surface CCR7 et CD45RA.

3.2. Les premiers essais de déplétion des greffons haploidentiques de CSH et autres stratégies d'optimisation

Certaines équipes ont essayé de manipuler les greffons haploidentiques avant leur réinjection chez les receveurs afin de diminuer l'alloréactivité et la GVH associée tout en préservant et potentialisant l'effet GVL (effet du greffon contre la leucémie) bénéfique. Pour cela, elles ont cherché à dépler certaines populations cellulaires spécifiques semblant être plus pourvoyeuses de GVH que de GVL. Ainsi, dans cette optique, Federmann *et al.* entreprennent en 2012 la déplétion des greffons haploidentiques en lymphocytes CD3⁺ et CD19⁺. La déplétion des lymphocytes T, acteurs principaux de la réaction de GVH aiguë est envisagée pour réduire cette GVH aiguë et la déplétion associée des lymphocytes B pour prévenir le risque de maladie lymphoproliférative liée à l'EBV (Epstein Barr Virus) lorsque le donneur est séropositif pour l'EBV et le receveur séronégatif pour l'EBV. Cette approche a permis de réaliser avec succès des greffes haploidentiques de CSH chez un certain nombre de sujets plus âgés et à haut risque en utilisant un conditionnement réduit. Cependant la diminution de l'incidence de la GVH ainsi que sa sévérité n'ont pas atteint l'objectif espéré (69).

Certaines équipes ont envisagé des approches plus ciblées des populations cellulaires à dépler. Il semble que les lymphocytes T $\gamma\delta$, cellules intermédiaires entre l'immunité innée et adaptative, contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$ aient un rôle potentiel bénéfique dans l'allogreffe en facilitant la prise de greffe et en ayant un effet GVL sans causer de GVH associée (70). Par conséquent certaines équipes se sont plutôt tournées vers la déplétion des lymphocytes T $\alpha\beta$ associée à la déplétion des lymphocytes B au lieu de dépler l'ensemble des lymphocytes T et B. Ainsi en 2013, Bertaina *et al.* rapportent les résultats de cette stratégie de déplétion appliquée à une cohorte de 45 enfants souffrant de leucémie aiguë. Elle a permis une prise de greffe rapide chez la majorité des enfants (44/45) et aucun enfant n'a développé de GVH aiguë viscérale ; seuls quelques cas de GVH aiguë cutanée légère à modérée ont été observés (71). Ainsi cette stratégie de déplétion apparaissait efficace dans la prévention de la GVH, cependant la médiane de suivi des patients dans cette étude est limitée et ces résultats nécessitent d'être explorés par des études ultérieures avec un suivi plus long pour mieux évaluer l'impact de cette stratégie sur le devenir des patients.

D'autres stratégies basées sur les propriétés des cellules T régulatrices pour diminuer la GVH sont apparues de façon concomitante. En 2014, Martelli *et al.*

proposent l'injection de cellules T régulatrices avant injection de greffons enrichis en cellules progénitrices CD34⁺ et de cellules T conventionnelles. Ce protocole est appliqué *in vivo* chez 45 patients sans immunosuppression post-transplantation et montre l'efficacité potentielle des cellules régulatrices sur la réduction de la survenue de GVH, mais rapporte un taux élevé d'infections opportunistes et de rechutes du fait de l'inhibition des cellules T conventionnelles (72,73).

Toutes ces approches éliminent ou inhibent les cellules T mémoires indispensables pour protéger le patient des infections fongiques ou virales après la greffe. Certaines équipes ont donc opté pour une stratégie basée sur la déplétion des greffons en cellules T naïves CD45RA⁺, considérant que la réponse alloréactive majeure est exercée par ces cellules. La déplétion des greffons en lymphocytes T naïfs CD45RA⁺ a été mise au point *ex vivo* grâce à la technologie CliniMACS[®] qui permet la réalisation de tri cellulaire par billes magnétiques et passage sur colonne des cellules pouvant ensuite être qualifiées pour administration *in vivo* (74,75). D'abord appliquée dans des greffes HLA-compatible avec des résultats satisfaisants (76), cette stratégie a récemment été appliquée dans la greffe haploidentique. En effet, Shook *et al.*, greffeurs de St Jude à Memphis ont publié en 2015 leur expérience de déplétion des lymphocytes T CD3⁺ CD45RA⁺ des greffons haploidentiques concernant 8 malades âgés de 8 à 18 ans ayant subi un conditionnement myéloablatif. Les patients ont eu une prise de greffe rapide et n'ont pas développé de GVH aiguë. Après un suivi médian de 171 jours, il n'y a eu aucun décès ni complications infectieuses (77). Cependant, à ce stade nous n'avons pas encore assez de recul au travers de cette étude en matière du nombre de patients traités et du délai de suivi post-greffe pour juger de l'efficacité de cette immunothérapie sur la maladie. De plus cette approche élimine également les cellules T CD8⁺ naïves indispensables dans l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale. En outre, les lymphocytes B et NK exprimant eux aussi le marqueur CD45RA dans des proportions significatives, sont également déplétés dans cette stratégie (diminution de 3 à 5 log par rapport au greffon non déplété) (75).

3.3. Notre stratégie de déplétion : déléter sélectivement les greffons haploidentiques de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺

3.3.1. Le potentiel alloréactif des cellules T CD4⁺ CCR7⁺ et leur implication dans la GVH aiguë

La stratégie de notre équipe repose sur une déplétion partielle et sélective en cellules T alloréactives naïves et centrales mémoires CD4⁺ CCR7⁺ des greffons

haploidentiques de CSP. Son objectif est de permettre le développement de la greffe haploidentique en contrôlant son potentiel alloréactif. En effet, notre équipe a montré qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ et supérieure à 73,5% des lymphocytes T CD4⁺ dans un greffon constitue un facteur de risque de survenue, de précocité et de sévérité de la GVH aiguë sans influence sur la GVH chronique ou la rechute (Figure 14) (78).

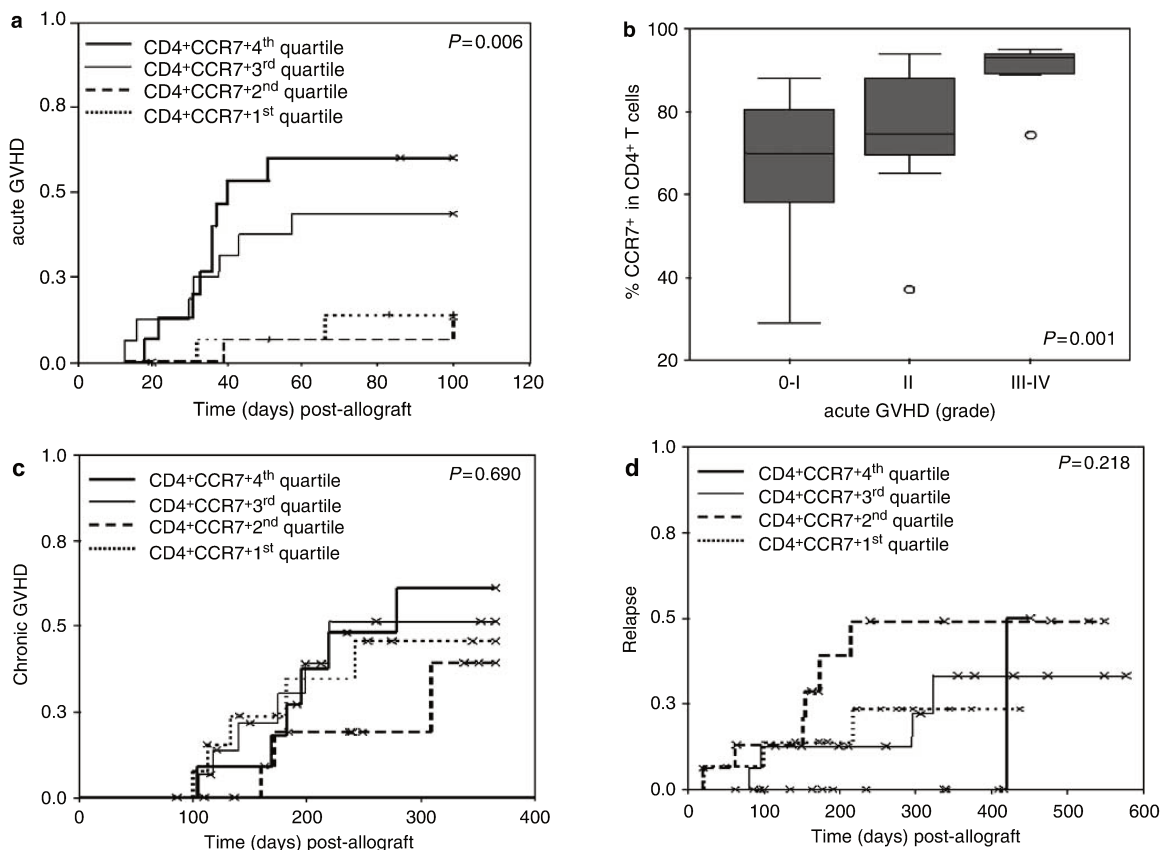


Figure 14 : Proportions de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans le greffon et incidence de GVH aiguë, chronique et rechute. (a) **Incidence cumulée de GVH aiguë** chez les receveurs classés en quartiles en fonction de la proportion en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de leur greffon (b) **Sévérité de la GVH aiguë** chez les receveurs en fonction de la proportion de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ du greffon (c) **Incidence cumulée de GVH chronique** chez les receveurs classés en quartiles en fonction de la composition en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de leur greffon (d) **Incidence cumulée de rechute** chez les receveurs classés en quartiles en fonction de la composition en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de leur greffon (78).

Nous avons confirmé ces données par une approche *in vitro* qui a montré la capacité alloréactive supérieure des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺. Leur réponse proliférative était associée à une production de cytokines proinflammatoires les rendant potentiellement inductrices de GVH aiguë (79). D'autres équipes se sont également penchées sur le potentiel alloréactif de ces cellules T CD4⁺ CCR7⁺. Notamment, l'équipe de Coghill par l'utilisation d'un modèle murin et de lymphocytes T CCR7^{-/-} montre une réduction de l'incidence de la GVH tout en préservant l'effet

GVL (80). En effet, il semble que ce soit les lymphocytes T mémoires effecteurs $CCR7^-$ qui contribuent davantage à l'effet GVL et à la reconstitution immunitaire sans impact majeur sur la GVH (81–83).

3.3.2. La déplétion en lymphocytes T $CD4^+ CCR7^+$ n'interfère pas sur l'immunité anti-infectieuse acquise

Dans l'objectif d'éliminer sélectivement les cellules T $CD4^+ CCR7^+$, notre équipe a complété sa preuve de concept par une approche *in vitro* évaluant l'immunité anti-infectieuse après déplétion. Nos résultats montrent qu'une déplétion partielle et sélective en lymphocytes T $CD4^+ CCR7^+$ sur 10 échantillons de CSP n'altère pas la réponse anti-infectieuse virale acquise (Figure 15), en particulier contre l'adénovirus et le cytomegalovirus (84), ce dernier étant un acteur majeur de morbi-mortalité post-greffe en cas de réactivation.

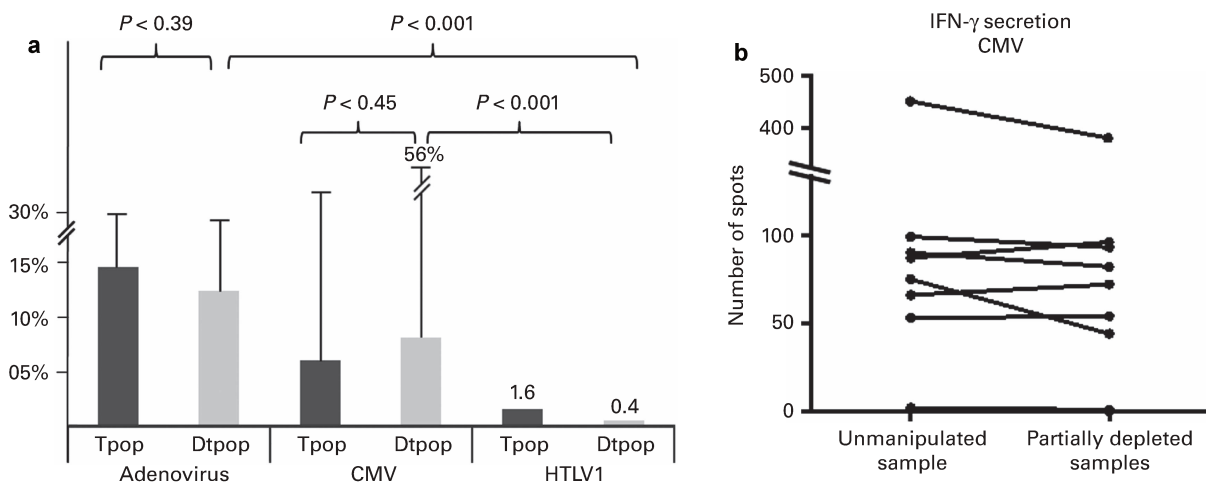


Figure 15 : Préservation de l'immunité anti-infectieuse virale après déplétion T $CD4^+ CCR7^+$ *in vitro* (a) Pourcentages moyens de lymphocytes T en division à J7 en présence de peptides viraux d'adénovirus, de CMV et de HTLV1 avant manipulation de l'échantillon de greffon (Tpop) et après déplétion des lymphocytes T $CD4^+ CCR7^+$ (Dtpop) (b) Production d'interféron γ par les cellules de l'échantillon de CSP en présence de peptides de CMV avant et après déplétion en lymphocytes T $CD4^+ CCR7^+$ par technique Elispot (84).

Par ailleurs, d'autres équipes ont montré le potentiel des lymphocytes T mémoires effecteurs $CCR7^-$ dans l'immunité anti-infectieuse (82,83).

3.3.3. Originalité de cette stratégie de déplétion

En déplaçant sélectivement les greffons haploidentiques en lymphocytes T $CD4^+ CCR7^+$, notre stratégie vise à éliminer des greffons les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs et centraux mémoires alloréactifs tout en préservant les lymphocytes T $CD8^+$ naïfs et mémoires ainsi que les lymphocytes T $CD4^+$ mémoires effecteurs,

indispensables à la reconstitution immunitaire rapide, à la préservation de l'immunité anti-infectieuse acquise (84) et à l'effet GVL (82,83).

De plus, et contrairement à la déplétion des cellules naïves CD45RA⁺ (75), cette stratégie permettra de préserver les lymphocytes B et NK au sein du greffon administré au receveur. Or les lymphocytes NK jouent un rôle crucial dans la défense du receveur contre les infections bactériennes, virales et fongiques (69,85) ainsi que dans la prise de greffe et dans l'effet GVL, notamment par l'intermédiaire de leurs récepteurs KIR et le *mismatch* de ces derniers dans la greffe haploidentique (18,86).

Enfin cette stratégie s'appuyant sur le CCR7 offre l'opportunité d'éliminer les lymphocytes T CD4⁺ centraux mémoires en plus des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Cela apparaît judicieux dans la mesure où il semble que les lymphocytes T CD4⁺ centraux mémoires sont également impliqués dans la GVH de façon plus modérée (75). Ceci est dû au fait que ces derniers sont responsables de réactivités croisées envers des antigènes viraux et certaines molécules HLA (87). Il apparaît donc tout à fait pertinent d'éliminer ces cellules dans le cadre de la greffe haploidentique.

3.3.4. Stratégie de tri : conditions pratiques de réalisation

Notre stratégie de tri des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ reposera sur la technologie CliniMACS[®] déjà adaptée à un usage clinique puisque déjà utilisée dans plusieurs essais cliniques (69,76,77). Étant donné que les cellules T CD4⁺ naïves et centrales mémoires expriment toutes deux les marqueurs CCR7 et CD62L, nous partions initialement sur l'idée d'utiliser un tri CD62L qui présente l'avantage que les réactifs de ce tri existent déjà en grade clinique. Cependant notre protocole est destiné à être appliqué à des greffons de CSP. Or sous l'action du G-CSF administré au donneur quelques jours avant le prélèvement du greffon par cytophérèse pour mobiliser les cellules souches en périphérie, il se produit un clivage enzymatique de la molécule CD62L à la surface des lymphocytes T (88–90). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de cibler la molécule CCR7. Cependant les réactifs du tri CCR7 n'existent pas en grade clinique à l'heure actuelle. Avant l'usage clinique, il sera donc indispensable de qualifier un lot de réactifs du tri CCR7 en grade clinique, ce qui est exclusivement une question administrative et pécuniaire. En effet il n'y a pas de toxicité des réactifs utilisés pour l'Homme.

Au départ, deux stratégies, toutes deux en deux étapes, s'offraient à nous pour réaliser un tri sélectif et dépléter les greffons de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ : (a) une sélection négative permettant de mettre de côté toutes les cellules

hormis la fraction de lymphocytes T $CD4^+$ sur laquelle s'ensuit une deuxième étape de sélection, positive, des cellules $CCR7^+$ ou (b) une double sélection positive : $CD4^+$ puis $CCR7^+$ sur la fraction positive issue du premier tri (Figure 16). Nous avons d'emblée écarté la stratégie (a) car elle présentait des inconvénients. En effet elle nécessitait de marquer un grand nombre de cellules non $CD4^+$, ce qui par conséquent engendre un coût élevé et risque davantage de saturer les colonnes de tri. De plus nous souhaitons être précis sur la population à déléter tout en conservant l'ensemble des autres cellules et cet objectif nous paraissait plus réalisable avec une double sélection positive (Figure 16).

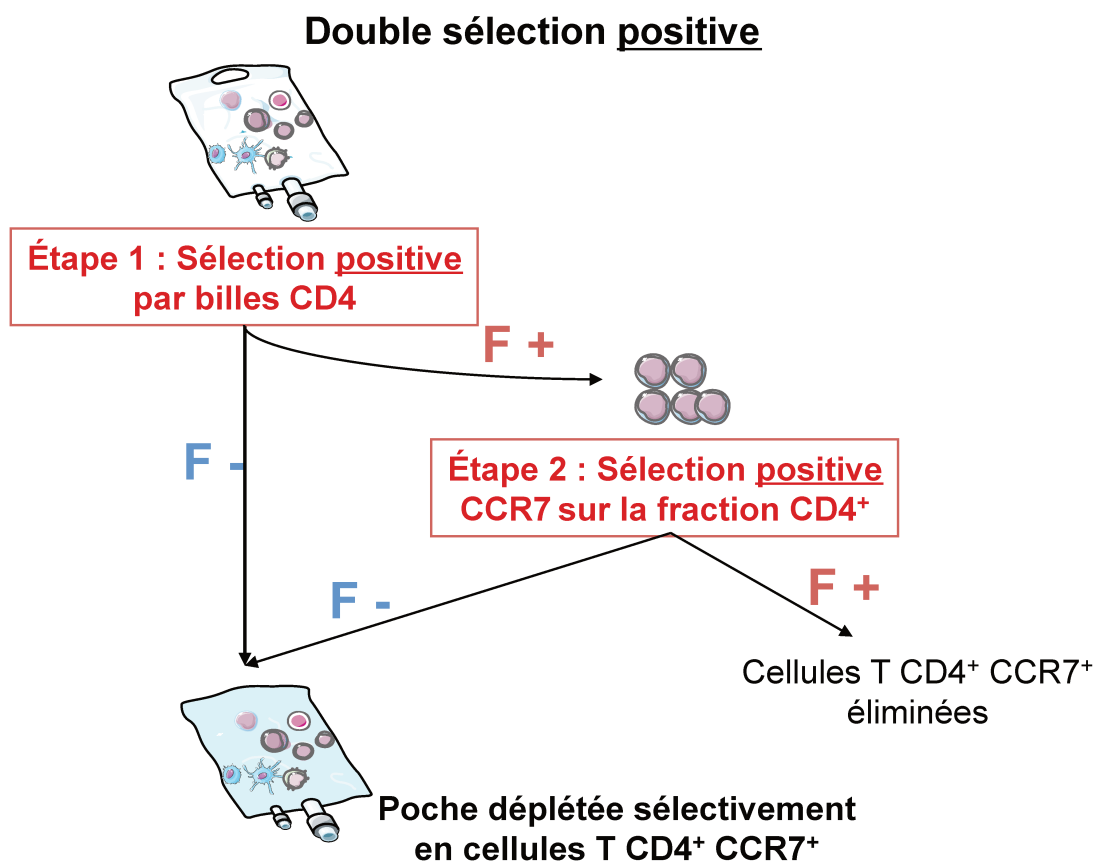


Figure 16 : Stratégie de tri reposant sur une double sélection positive des lymphocytes T $CD4^+$ $CCR7^+$ (F + : fraction positive, F - : fraction négative).

Enfin, en pratique nous avons défini pour notre stratégie des critères seuils à la fois pour la préservation des populations cellulaires non ciblées par le tri et l'élimination de la population cible T $CD4^+$ $CCR7^+$. Ces seuils sont basés sur la littérature et l'utilisation que fait déjà l'EFS du CliniMACS® pour sa conception des *boosts* de cellules progénitrices $CD34^+$. Ainsi, il a été établi que le greffon devait être déplété à hauteur d'au moins 80% des lymphocytes T $CD4^+$ $CCR7^+$ initiaux afin que ceux-ci représentent moins de 50% des lymphocytes T $CD4^+$ réinjectés au receveur. En effet l'originalité du projet repose dans le fait qu'on effectue une déplétion partielle

et sélective. L'objectif est cependant supérieur au seuil établi dans l'article de l'équipe publié en 2006 (78), mais on se situe désormais dans le cadre de la greffe haploidentique ce qui n'était pas le cas dans cette étude. D'autre part nous souhaitons préserver l'ensemble des autres populations lymphocytaires (T CD8⁺, B et NK) à hauteur d'au moins 70% de leur quantité initiale (91). Concernant les cellules progénitrices CD34⁺, nous souhaitons un rendement également d'au moins 70% (75,92) et/ou une quantité dans l'échantillon déplété supérieure ou égale à 3.10⁶ CD34⁺/kg (rapporté au poids du patient à greffer) (63).

3.3.5. Objectifs à terme du projet de déplétion des greffons haploidentiques en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺

L'objectif de ce projet, après validation des étapes *in vitro* sur échantillons de CSP puis poches destinées à la destruction, sera la mise en place d'un essai clinique de phase I/II. Le succès de cette stratégie permettrait d'étendre l'accès à la greffe haploidentique, actuellement en plein essor, à un plus grand nombre de patients en diminuant les injections de cyclophosphamide post-greffe, qui du fait de son importante toxicité (42,43), en réduit les indications potentielles aujourd'hui.

De plus, ce protocole s'appuie sur l'utilisation de greffons de CSP dont le choix est aujourd'hui privilégié bien qu'historiquement ce sont les greffons de moelle osseuse qui étaient préférés. En effet, bien qu'ils semblent plus pourvoyeurs de GVH, notamment chronique, que les greffons de moelle osseuse (37,93), en raison de la quantité plus importante en cellules matures immunocompétentes, les greffons de CSP présentent l'avantage d'être plus facilement disponibles. En effet, il s'agit d'un prélèvement réalisé en périphérie par cytophérèse et pouvant être renouvelé deux jours consécutifs chez le donneur. La procédure de tri sur CSP permettra au moment de notre essai clinique de prélever une poche de secours pour le receveur chez le donneur au cas où le protocole de tri n'aboutirait pas. En outre, en cas d'incompatibilité ABO entre donneur et receveur, les greffons de CSP obtenus par cytophérèse sont plus intéressants car ils ne nécessitent pas de desérythrocytation (94). Enfin, les prélèvements de CSP étant plus riches en cellules que les prélèvements de moelle osseuse (64,65) ceci constitue un atout pour la réalisation d'un tri qui entraîne dans tous les cas des pertes cellulaires non spécifiques.

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Recueil des échantillons

Nous avons travaillé sur des échantillons de CSP préparés par le laboratoire de Thérapie Cellulaire de l'EFS de Lille à partir des poches de donneurs prêtes à être infusées aux receveurs. En effet, pour chaque préparation de greffon par l'EFS, il y a un échantillon destiné au Laboratoire d'Immunologie du Centre de Biologie-Pathologie en vue de réaliser l'immunophénotypage complet du greffon. Nos tests ont été effectués sur la partie de l'échantillon non utilisé pour effectuer l'immunophénotypage. Nous disposons des consentements des donneurs pour les échantillons sur lesquels nous avons travaillé. Au total, nous avons travaillé sur 9 échantillons de CSP de volume moyen égal à 1,2 mL (compris entre 0,9 mL et 2,3 mL) et dont la concentration moyenne en cellules mononucléées (CMN) était de $175.10^6/\text{mL}$ [$50.10^6/\text{mL}$ - $326.10^6/\text{mL}$].

Comme le nombre d'échantillons de CSP était limité, nous avons réalisé certaines étapes sur CMN de sujets sains pour avancer dans notre réflexion dans la mesure où les conclusions pouvaient être transposables à des échantillons de CSP. Des prélèvements sanguins sur tubes EDTA (respectivement 10 tubes et 13 tubes de 6 mL) ont ainsi été réalisés chez deux donneurs sains permettant de récupérer respectivement 87.10^6 et 140.10^6 CMN. Les donneurs sains ont donné leur consentement après une information éclairée. L'isolement des CMN a été réalisé sur Ficoll (Milieu de séparation des lymphocytes de densité $1,077\pm 0,001$, Eurobio, France ; Eau physiologique NaCl 0,9% stérile Versylène[®], Fresenius Kabi, France ; tubes Falcon[®] en polypropylène stérile 50 mL, Mexique ; programme de centrifugation : 1800 RPM, 30 minutes, 20°C, centrifugeuse 5810R eppendorf, France).

2. Tris

2.1. Traitement de l'échantillon de CSP avant tri

Avant toute étape de tri, chaque échantillon est dilué dans 5 mL de tampon de séparation (autoMACS[®] Running Buffer, Miltenyi Biotec, Allemagne, contenant de la BSA, de l'EDTA, du tampon phosphate salin, de l'azide 0.09%, pH 7,2) conservé

stérilement à 4°C après ouverture. L'échantillon est ensuite filtré (filtres de pré-séparation 30 µm, Miltenyi Biotec, Allemagne) puis le filtre est rincé par du tampon de séparation afin d'obtenir un volume final de 10 mL. Ces étapes de dilution et filtration ont été réalisées sous hotte à flux d'air laminaire afin que le prélèvement reste stérile. À cette étape de filtration, succède une étape de centrifugation (300G, 10 minutes, température ambiante) afin de récupérer les cellules dans le culot après assèchement de ce dernier.

Une quantité moyenne de $30 \cdot 10^6$ CMN [$12 \cdot 10^6$ - $80 \cdot 10^6$] a été triée à chaque tri lors de nos essais. Ainsi, un total de 37 tris a été réalisé à partir de nos 11 échantillons (9 CSP + 2 donneurs de CMN).

2.2. Procédure générale du tri automatisé

L'étape de tri en elle-même est automatisée puisqu'elle s'effectue sur l'automate AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Allemagne) (*Figure 17*). Le fonctionnement de l'automate requiert un flacon de tampon de séparation (autoMACS® Running Buffer, Miltenyi Biotec, Allemagne, contenant de la BSA, de l'EDTA, du tampon phosphate salin, de l'azide 0.09%, pH 7,2), un flacon de solution de lavage (autoMACS™ Pro Washing Solution, Miltenyi Biotec, Allemagne, contenant des détergents, pH 11,5-12,5), un flacon d'éthanol à 70% et deux colonnes de séparation (autoMACS Separation Columns, Miltenyi Biotec, Allemagne).

Après paramétrage de l'emplacement de l'échantillon et du programme à utiliser, le processus de tri commence. Après chargement de la colonne avec l'échantillon à trier préalablement incubé avec les billes magnétiques, l'automate élimine d'abord la fraction négative, c'est-à-dire la fraction contenant les cellules non retenues par la colonne car ne disposant pas à leur surface de billes magnétiques. Puis dans un deuxième temps, l'automate élimine la fraction positive contenant les cellules retenues par la colonne grâce aux billes immunomagnétiques à leur surface (*Figure 17*). Pour les petits échantillons que nous avons traités, l'étape de tri durait entre 7 et 9 minutes suivant le programme de tri choisi.

Ainsi à l'issue de l'étape de tri, on dispose de deux fractions, une négative et une positive. À elles deux, les fractions contiennent l'ensemble des cellules de notre échantillon initial de CSP. Cependant, quelques pertes non spécifiques de cellules sont à déplorer.

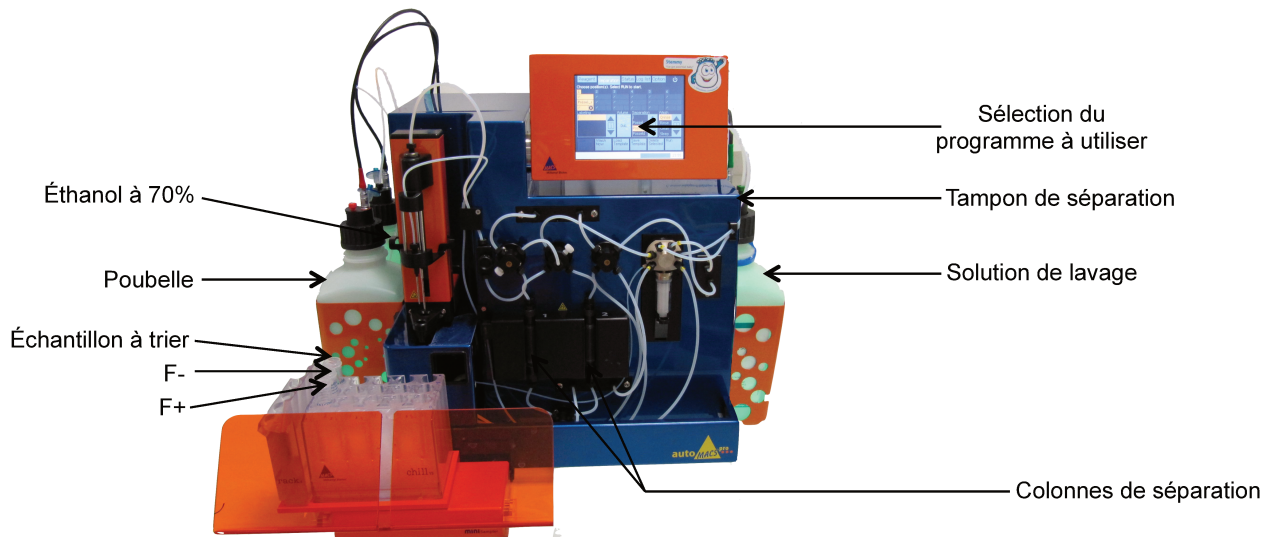


Figure 17 : Photographie de l'automate de tri AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec) utilisé lors des manipulations (F- : fraction négative, F+ : fraction positive).

2.3. Tri CD4

Le tri CD4 est un tri direct et fait intervenir l'utilisation de billes couplées à des anticorps anti-CD4 (CD4 Microbeads human, Miltenyi Biotec, Allemagne), dénommées par la suite billes CD4 dans l'ensemble de ce travail par souci de synthèse. Après l'étape de centrifugation préalable (citée dans le paragraphe 2.1. ci-dessus), le culot est repris dans 80 $\mu\text{L}/10^7$ CMN de tampon de séparation puis 20 $\mu\text{L}/10^7$ CMN de billes CD4 sont ajoutés. S'ensuit une étape d'incubation de 15 minutes à 4°C au réfrigérateur avant passage sur l'automate de tri. Si nécessaire après incubation, le volume de l'échantillon est complété à 500 $\mu\text{L}/10^8$ CMN car l'automate nécessite un volume minimum de 500 μL pour trier.

Lors des deux premières manipulations, les quantités de tampon et de billes avaient été rationalisées au nombre de cellules nucléées totales (CNT) (*gate* : cellules viables en cytométrie) avant d'être plus tard ajustées au nombre de CMN.

Les premières manipulations ont été réalisées avec la concentration en billes CD4 aux recommandations fournisseur (citée ci-dessus), puis ont été réalisés successivement des tris CD4 au demi, au dixième, au vingtième, au cinquantième et au centième par rapport aux recommandations fournisseur ; la concentration en billes a donc, par conséquent été diluée au ratio souhaité.

Le programme sur l'AutoMACS Pro recommandé pour le tri CD4 par le fournisseur est le programme « Possel », de sensibilité moindre, s'appliquant aux

populations cellulaires à trier bien représentées avec un cluster de différenciation bien exprimé. Cependant, compte tenu des dilutions des billes dans les manipulations ultérieures, nous avons également été amenés à utiliser un programme de tri plus sensible : « Possel-s », associé à une vitesse de flux dans la colonne de séparation moins élevée permettant un temps de passage dans la colonne plus long pour améliorer la récupération des cellules d'intérêt.

2.4. Tri CD8

Le tri CD8, également tri direct, nécessite des billes couplées à des anticorps anti-CD8 (CD8 Microbeads human, Miltenyi Biotec, Allemagne), nommées billes CD8 dans la suite de ce travail. Comme pour le tri CD4, le culot après centrifugation est repris dans 80 $\mu\text{L}/10^7$ CMN de tampon de séparation puis on ajoute 20 $\mu\text{L}/10^7$ CMN de billes CD8 avant incubation (15 minutes à 4°C) et passage sur l'automate de tri. Si nécessaire après incubation, le volume de l'échantillon est complété à 500 $\mu\text{L}/10^8$ CMN.

Des concentrations en billes CD8 au demi par rapport aux recommandations fournisseur ont également été testées.

De même que pour le tri CD4, le programme recommandé correspond au programme « Possel ». Cependant, ce dernier ne satisfaisant pas à nos exigences lors des premiers essais, nous avons adopté le programme « Possel-s » pour le tri CD8.

2.5. Tri CD19

Le tri CD19, tri direct permettant de trier les lymphocytes B, fait quant à lui, intervenir des billes couplées à des anticorps anti-CD19 (CD19 Microbeads human, Miltenyi Biotec, Allemagne), nommées billes CD19. Nous avons toujours réalisé le tri CD19 simultanément au tri CD8. Par conséquent, après reprise du culot dans le tampon de séparation conformément aux quantités citées ci-dessus, les billes CD19 ont été ajoutées à hauteur de 20 $\mu\text{L}/10^7$ CMN en même temps que les billes CD8. De même que lors de tous les tris préalables, le volume de l'échantillon était complété à 500 $\mu\text{L}/10^8$ CMN après incubation et si nécessaire.

C'est le programme « Possel-s » (plus sensible) sur l'AutoMACS Pro qui a été utilisé pour l'ensemble de nos tris simultanés CD19 et CD8.

2.6. Tri CCR7

Le tri CCR7 est un tri indirect, donc en deux étapes. Le culot cellulaire est repris dans un volume de tampon de séparation de $100 \mu\text{L}/10^7$ CMN puis on ajoute $10 \mu\text{L}/10^7$ CMN d'anticorps anti-CCR7 biotinylés (CD197 (CCR7)-Biotin human, Miltenyi Biotec, Allemagne) à l'échantillon avant d'incuber à 4°C au réfrigérateur pendant 10 minutes. Après incubation, vient une étape de lavage des cellules dans $1\text{-}2 \text{ mL}/10^7$ CMN de tampon de séparation puis une étape de centrifugation (300G, 10 minutes, température ambiante). La deuxième partie du tri consiste à reprendre le culot après assèchement dans $80 \mu\text{L}/10^7$ CMN de tampon de séparation auquel on ajoute $20 \mu\text{L}/10^7$ CMN de billes couplées à l'anti-biotine (AntiBiotin Microbeads, Miltenyi Biotec, Allemagne). On incube à nouveau pendant 15 minutes à 4°C et comme au préalable, le volume de l'échantillon est complété à $500 \mu\text{L}/10^8$ CMN après incubation si nécessaire et avant l'étape de tri sur l'AutoMACS Pro.

Au cours de nos manipulations, nous avons testé le tri CCR7 de l'échantillon de CSP avant tout autre tri en appliquant le protocole détaillé ci-dessus. Le tri CCR7 a aussi été testé simultanément au tri CD4 : dans cette situation, l'incubation avec les anticorps anti-CCR7 biotinylés était réalisée d'emblée et seule puis l'incubation avec les billes CD4 était faite dans un second temps en même temps que l'incubation avec les billes couplées à l'anti-biotine. Le tri CCR7 a également été réalisé après tri CD8 ou tris CD8-CD19 simultanés. Dans ce dernier cas, à l'issue du tri CD8 ou des tris CD8-CD19 simultanés, la fraction négative était centrifugée à 300G pendant 10 minutes puis reprise dans le tampon de séparation. Le tri CCR7 était alors entrepris selon la procédure décrite précédemment.

Des tris CCR7 à des concentrations différentes de celles recommandées par le fournisseur ont également été testés : au demi, au quart, au dixième et au cinquantième. Lors de ces dilutions, nous avons décidé de faire varier les concentrations en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes couplées à l'anti-biotine de façon coordonnée.

Pour le tri CCR7, différents programmes de tris sur l'AutoMACS Pro ont également été essayés : « Possel » (programme recommandé par le fournisseur pour ce tri), « Possel-s » (programme plus sensible) et « Deplete » (programme de déplétion pour lequel la population d'intérêt est celle non marquée et doit être bien représentée).

3. Évaluation de la capacité de détachement des billes des lymphocytes T CD4⁺ mis en culture

3.1. Étape de mise en culture

Les billes magnétiques CD4, qualifiées de biodégradables par le fournisseur sont accrochées aux lymphocytes T CD4⁺ à l'issue du tri positif. Pour passer au second tri CCR7 au sein des cellules CD4⁺ afin d'obtenir une fraction CD4⁺ CCR7⁺ et une fraction CD4⁺ CCR7⁻, il est indispensable d'obtenir le détachement préalable des billes CD4 ayant permis le premier tri. Dans le cas contraire, toutes les cellules seraient retenues par la colonne de séparation indifféremment de la présence ou pas à leur surface de billes associées aux anticorps anti-CCR7.

Pour effectuer ce détachement, la fraction positive CD4⁺ issue du tri était centrifugée à 300G pendant 10 minutes, puis le culot asséché était repris dans le milieu de culture TexMACS (Medium research grade, Miltenyi Biotec, Allemagne, contenant de la glutamine) à hauteur de 1.10^6 CMN/mL. Les cellules étaient ensuite mises en culture en conditions stériles dans une plaque de culture Cellstar[®] stérile 24 puits de 2 mL à fond plat (Greiner bio-one, Autriche) (1.10^6 CMN/mL/puits). Des antibiotiques, type pénicilline-streptomycine (Gibco, USA) étaient ajoutés dans chaque puits à hauteur de 2 μ L/mL pour éviter toute prolifération bactérienne dans nos puits de culture.

En parallèle de la fraction positive mise en culture, un témoin de culture était effectué. Il s'agissait de la CSP ou l'échantillon de CMN correspondant, non trié, afin d'évaluer la mortalité cellulaire liée à la culture.

Les cultures à 37°C et sous 5% de CO₂ ont été maintenues initialement dans des délais compatibles avec une réinjection d'un greffon (4 jours). Des cultures sur une période de 10 jours ont été également menées afin d'observer à quel temps exactement se produisait le détachement de l'ensemble des billes CD4 à la surface des lymphocytes.

3.2. Évaluation du détachement des billes CD4 de la surface des lymphocytes T CD4⁺

La méthode choisie pour évaluer le détachement des billes CD4 consistait en un repassage des cellules en culture sur l'automate de tri AutoMACS Pro et une analyse immunophénotypique afin d'évaluer la mortalité cellulaire.

Un suivi journalier et donc des repassages quotidiens sur l'automate de tri étaient réalisés (1/2 à 1 puits/jour). Les cellules dans chaque fraction à l'issue des repassages étaient numérotées lors de l'analyse immunophénotypique par cytométrie en flux afin d'estimer le pourcentage de détachement des billes.

4. Analyse immunophénotypique par cytométrie en flux et interprétation des résultats

À partir de notre échantillon initial de CSP (dilué au vingtième dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4, Sigma-Aldrich, Suisse)), avant toute manipulation (de même qu'à partir de notre échantillon de CMN issu de donneur sain), des analyses immunophénotypiques ont été réalisées afin de les comparer à ce que l'on obtient après chaque étape de tri dans chacune des deux fractions, positive et négative, et ainsi évaluer les rendements des tris concernant les différentes populations lymphocytaires.

Des analyses immunophénotypiques ont également été réalisées lors des étapes de culture de façon journalière avant et après repassage sur l'automate de tri afin d'évaluer la mortalité cellulaire et le pourcentage de détachement des billes.

4.1. Immunophénotypage standard et numération

L'immunophénotypage standard consiste en l'analyse des populations lymphocytaires T CD4⁺, T CD8⁺, B et NK. On prélève 50 ou 100 µL de notre échantillon à analyser auquel on ajoute respectivement soit 10 µL, soit 20 µL du *mix* standard, comportant du CD45 Ko (100 µL, Beckman Coulter, France), du CD3 FITC (200 µL, Beckman Coulter, France), du CD4 PacB (50 µL, Beckman Coulter, France), du CD8 APC (50 µL, Beckman Coulter, France), du CD19 Pc5.5 (100 µL, Beckman Coulter, France), du CD16 Pe (200 µL, Beckman Coulter, France) et du CD56 Pe (200 µL, Beckman Coulter, France) (*Tableau 3*). Le *mix* d'anticorps monoclonaux conjugués et l'échantillon sont incubés pendant 15 minutes. Après incubation, les billes (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, France) pour la numération des cellules sont ajoutées dans des proportions équivalentes à l'échantillon à analyser (soit 50 ou 100 µL).

Notre combinaison d'anticorps pour l'immunophénotypage standard a été modifiée pour certaines manipulations afin de mieux distinguer les monocytes des lymphocytes NK. Dans cette combinaison, le CD3 FITC a été remplacé par du CD3 Pc7 (BD, USA) et du CD14 FITC (Beckman Coulter, France) a été ajouté

(Tableau 3). Pour cette combinaison, les 8 anticorps sont ajoutés en quantités équivalentes à hauteur de 2,5 μL chacun pour un volume de 50 ou 100 μL d'échantillon à analyser.

L'immunophénotypage standard fait partie de l'analyse immunophénotypique réalisée de façon journalière lors de la culture des lymphocytes T CD4^+ et après repassage sur l'automate de tri pour estimer le pourcentage de détachement des billes.

4.2. Immunophénotypage des sous-populations de cellules T conventionnelles

Nous avons déterminé les proportions des différentes sous-populations lymphocytaires T de nos échantillons, à savoir les lymphocytes T naïfs, centraux mémoires, mémoires effecteurs et au stade terminal de différenciation au sein des compartiments T CD4^+ et T CD8^+ .

Une fraction de 50 μL de l'échantillon est incubée pendant 15 minutes avec 15 μL du *mix* sous-populations T, comportant les anticorps suivants : CD3 Pc7 (75 μL , BD, USA), CD4 Ko (75 μL , Beckman Coulter, France), CD8 APC (75 μL , Beckman Coulter, France), CD45RA FITC (300 μL , Beckman Coulter, France), CCR7 Pe (300 μL , Beckman Coulter, France) et CD62L PacB (90 μL , Beckman Coulter, France) (Tableau 3). À l'issue de l'incubation, une lyse des hématies est réalisée en ajoutant 1 mL de solution de lyse alcaline (Versalyse, Beckman Coulter, France) dans notre tube pendant 10 minutes puis 2 lavages successifs dans du PBS sont réalisés.

Immunophénotypages	Combinaison d'anticorps monoclonaux	Sous-populations identifiées
Populations lymphocytaires majeures	CD45 Ko CD3 FITC CD4 PacB CD8 APC CD19 Pc5.5 CD16 Pe CD56 Pe	LcT CD4⁺ : CD3 ⁺ CD4 ⁺ LcT CD8⁺ : CD3 ⁺ CD8 ⁺ LcB : CD19 ⁺ NK : CD3 ⁻ CD16 ⁺ et/ou 56 ⁺
	CD45 Ko CD14 FITC CD3 Pc7 CD4 PacB CD8 APC CD19 Pc5.5 CD16 Pe CD56 Pe	LcT CD4⁺ : CD3 ⁺ CD4 ⁺ LcT CD8⁺ : CD3 ⁺ CD8 ⁺ LcB : CD19 ⁺ NK : CD3 ⁻ CD16 ⁺ et/ou 56 ⁺ (Monocytes : CD45⁺ CD14⁺)
Sous-populations lymphocytaires T	CD3 Pc7 CD4 Ko CD8 APC CD45RA FITC CCR7 Pe CD62L PacB	LcT naïfs (T_N) : CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ LcT mémoires centraux (T_{CM}) : CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ LcT mémoires effecteurs (T_{EM}) : CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ LcT mémoires de différenciation terminale (T_{TD}) : CD45RA ⁺ CCR7 ⁻

Tableau 3 : Combinaisons d'anticorps monoclonaux utilisés et marqueurs identifiant les différentes populations lymphocytaires lors des immunophénotypages standards et d'identification des sous-populations T. (LcT : Lymphocytes T, LcB : Lymphocytes B)

4.3. Immunophénotypage explorant la viabilité des cellules

L'exploration de la viabilité des CMN a reposé sur l'utilisation de l'iodure de propidium (IP). C'est un agent intercalant des acides nucléiques s'incorporant dans l'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Par conséquent les cellules mortes sont IP⁺.

Une fraction de 50 µL de l'échantillon à étudier est incubée avec 5 µL de CD45 Pc7 (Beckman Coulter, France) pendant 15 minutes puis 5 µL d'IP (1,0 mg/mL, Sigma-Aldrich, Suisse) sont ajoutés pendant 2 minutes juste avant l'analyse.

4.4. Immunophénotypage explorant les cellules progénitrices CD34⁺

Un volume de 50 µL de l'échantillon à analyser est incubé en présence de 3 µL de CD45 Ko et 3 µL de CD34 Pc7 (Beckman Coulter, France) pendant 15 minutes. Après incubation et avant analyse au cytomètre, les billes (Flow-Count Fluospheres, Beckman Coulter, France) sont ajoutées dans des proportions équivalentes à notre échantillon à étudier.

La viabilité des cellules progénitrices CD34⁺ a également été explorée. Pour ce faire, après l'analyse au cytomètre des cellules CD34⁺, 3 µL d'IP sont ajoutés. Après 2 minutes d'incubation, le tube est à nouveau passé au cytomètre.

4.5. Autres immunophénotypages

Les immunophénotypages cités dans ce paragraphe ont été réalisés de manière ponctuelle afin de répondre à des questions spécifiques.

4.5.1. Analyse de l'expression du CCR7 par les différentes populations leucocytaires

Pour explorer l'expression du CCR7 par les différentes populations leucocytaires, une fraction de CSP (initiale, non triée) était incubée avec 5 µL de CD45 Ko, 10 µL de CD3 FITC, 5 µL de CD19 PacB (Beckman Coulter, France), 5 µL de CD16 APC (Beckman Coulter, France) et 10 µL de CCR7 Pe pendant 15 minutes. L'étude de l'expression du CCR7 par les cellules progénitrices CD34⁺ a été réalisée de manière séparée par un immunomarquage CD45 Ko, CD34 Pc7, CCR7 Pe. Après incubation, une lyse des hématies a été réalisée sur l'automate TQ prep (Beckman Coulter, France) avec les réactifs Immunoprep (Immunoprep Reagent System) puis 2 lavages dans du PBS ont suivi.

4.5.2. Immunophénotypage explorant les sous-populations lymphocytaires B

Pour distinguer les sous-populations lymphocytaires B dans les différents échantillons à étudier, les échantillons étaient au préalable lavés à 2 reprises dans du PBS + 10% de SVF (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA) afin d'éliminer les immunoglobulines plasmatiques susceptibles de se lier aux anticorps anti-IgD. Les échantillons étaient ensuite incubés avec 3 µL de CD45 Ko, 3 µL de CD19 Pc7 (Beckman Coulter, France), 5 µL de CD27 APC (BD, USA), 10 µL d'IgD FITC (Dako, Danemark) et 10 µL de CCR7 Pe pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. À l'issue de l'incubation, une lyse des hématies était réalisée en ajoutant 1 mL de solution de lyse alcaline (Versalyse) pendant 15 minutes puis 2 lavages dans du PBS + 10% de SVF étaient effectués avant l'analyse.

4.6. Analyse des résultats

Les données concernant l'analyse immunophénotypique sont obtenues par cytométrie en flux suite au passage des tubes sur le cytomètre NaviosTM (Flow Cytometer, Beckman Coulter, France). Les contrôles de qualité internes (Flow Check Pro Fluorospheres (1 fois/jour) et Flow Set Pro Fluorospheres (1 fois/semaine), Beckman Coulter, France) sont effectués sur le cytomètre pour s'assurer de la conformité de nos résultats.

Les résultats obtenus sont ensuite analysés et interprétés grâce au logiciel Kaluza (Beckman Coulter, France) permettant d'effectuer les différents *gating* et ainsi d'enregistrer nos protocoles afin de les appliquer de façon identique à tous nos échantillons.

L'analyse des résultats de numération cellulaire tient compte de la dilution de la CSP initiale.

III- RÉSULTATS

1. Première stratégie : développement d'un double tri positif CD4 CCR7

1.1. Évaluation du tri CD4

Dans un premier temps, nous avons procédé à un tri positif CD4 sur une première CSP en utilisant les billes CD4 aux recommandations fournisseur, c'est-à-dire à la concentration de $20 \mu\text{L}/10^7$ cellules nucléées totales (CNT) et le programme de tri recommandé « Possel » sur le trieur AutoMACS Pro. Cette première manipulation nous a permis de vérifier la bonne spécificité et sensibilité du tri CD4. En effet, nous obtenons une fraction positive pure, contenant uniquement des cellules T CD4⁺ (le tri est donc sélectif) et une fraction négative dépourvue de cellules T CD4⁺ (Tableau 4). Nous constatons que les monocytes exprimant faiblement le marqueur CD4 à leur surface ne sont pas retenus par le tri CD4.

CSP1	Fraction positive (10^6 cellules)	Fraction négative (10^6 cellules)
CMN	6,6	20,5
T CD4 ⁺	6,2	0,3
T CD8 ⁺	0,1	5,1
B	0,01	1,7
NK	0,01	1,7

Tableau 4 : Composition cellulaire des fractions positive et négative (en millions de cellules) à l'issue du tri CD4 aux conditions fournisseur réalisé sur une première CSP.

1.2. Évaluation du détachement des billes magnétiques CD4

1.2.1. Approche standard

Notre objectif est d'extraire les cellules CD4⁺ CCR7⁺ des cellules CD4⁺ triées positivement afin de récupérer les cellules T CD4⁺ CCR7⁻ pour les réinjecter ultérieurement au receveur. Pour ce faire, il est nécessaire que les billes CD4 fixées sur les cellules CD4⁺ de la fraction positive se détachent rapidement afin de pouvoir procéder au deuxième tri CCR7.

Afin de vérifier ce détachement, nous avons mis la fraction positive CD4⁺ en culture à hauteur de 1 million de cellules mononucléées (CMN)/mL par puits dans le

milieu de culture préconisé par le fournisseur, TexMACS. Dans l'objectif de la greffe haploidentique avec un greffon appauvri en cellules $CD4^+ CCR7^+$, la fraction $CD4^+ CCR7^-$ doit pouvoir être réinjectée rapidement au malade puisque ce dernier va recevoir une injection d'Endoxan[®] dès J3. En effet, si les cellules sont réinjectées de façon trop rapprochée de la cure d'Endoxan[®], elles risquent d'être plus facilement détruites. Nous avons donc choisi d'évaluer le détachement des billes sur la fraction positive en culture dans un délai de 1 à 4 jours après le tri. Nous avons ainsi, à différents temps de culture, estimé la perte cellulaire liée à la mortalité et quantifié la fraction $CD4^+$ récupérée après repassage sur la colonne de tri. Si les billes magnétiques se sont détachées de la surface cellulaire, les cellules ne seront plus retenues par le champ magnétique de la colonne et les cellules $CD4^+$ se retrouveront dans la fraction négative. À noter que ce sont bien les billes couplées aux anticorps anti-CD4 qui devraient se détacher des anticorps anti-CD4 et non les anticorps anti-CD4 (emmenant ainsi les billes) qui se détachent du CD4 à la surface des cellules, ces derniers étant fixés sur le CD4 de façon quasiment irréversible.

À J1 les cellules retrouvées dans la fraction négative représentent en moyenne 10% des cellules introduites sur le trieur ce même jour, traduisant ainsi une faible proportion de détachement des billes. Au terme des 4 jours de culture ce pourcentage n'évolue pas et révèle ainsi l'absence de détachement des billes magnétiques au cours du temps. De plus, plus le nombre de jours de culture augmente, plus la viabilité des cellules dans les puits diminue. Le suivi des puits de culture au microscope inversé montre en outre, au fil du temps, la formation d'agrégats cellulaires dans les puits, conduisant à un nombre conséquent de cellules T $CD4^+$ ne pouvant faire l'objet d'un tri CCR7 ultérieur.

1.2.2. Approches pour améliorer le détachement des billes CD4

1.2.2.1. Réduction au demi de la concentration en billes CD4 par rapport aux recommandations fournisseur

Ces approches ont été développées à partir de CMN d'un sujet volontaire sain. Dans cette manipulation, nous avons testé en parallèle les billes CD4 aux recommandations fournisseur ($20 \mu\text{L}/10^7$ CNT) et, sur une autre fraction, les billes à une concentration au demi ($10 \mu\text{L}/10^7$ CNT). À l'issue du tri, avec une concentration en billes au demi, nous obtenons un tri sensible et spécifique puisque la fraction positive est strictement composée de cellules T $CD4^+$ et la fraction négative contient moins de 3% de l'ensemble des cellules T $CD4^+$.

Si ces résultats valident l'utilisation d'une concentration des billes au demi par rapport aux recommandations fournisseur, la réduction du nombre de billes n'améliore pas leur détachement. À J1, la proportion de cellules dans la fraction négative ne dépasse pas 10% des cellules introduites sur le trieur (*Figure 18 (b)*). De plus, ce pourcentage reste stable jusqu'à 10 jours après la mise en culture, permettant de conclure au détachement de 10% des billes à J10 quelle que soit la concentration de billes utilisée (pur ou au demi) (*Figure 18 (a) et (b)*) alors que, parallèlement la viabilité des cellules décroît au fil du temps.

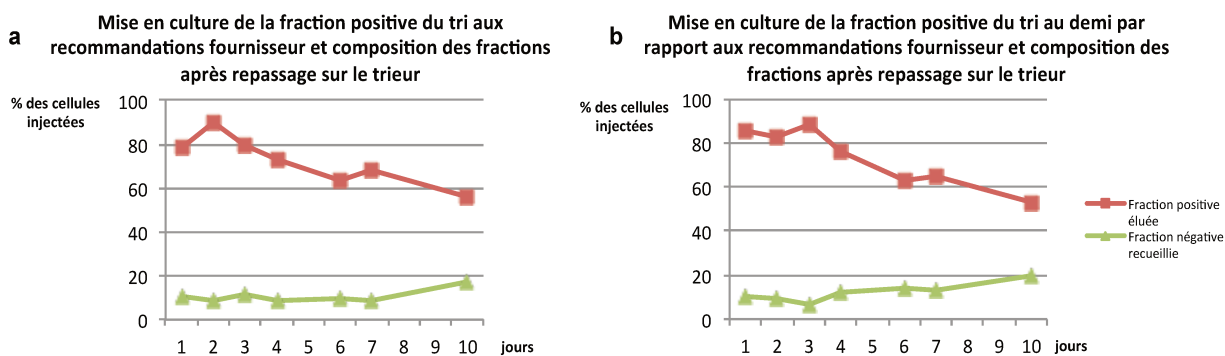


Figure 18 : Représentation des différentes fractions obtenues après passage des cellules triées CD4⁺ maintenues en culture de 1 à 10 jours. (a) Tri CD4 effectué aux recommandations fournisseur. (b) Tri CD4 effectué avec une réduction au demi par rapport aux recommandations fournisseur.

1.2.2.2. Réduction au dixième et au centième de la concentration en billes CD4 par rapport aux recommandations fournisseur

Nous avons comparé sur un même échantillon de CSP l'utilisation des billes CD4 à la concentration au demi ($10 \mu\text{L}/10^7 \text{ CMN}$), au dixième ($2 \mu\text{L}/10^7 \text{ CMN}$) et au centième ($0,2 \mu\text{L}/10^7 \text{ CMN}$) par rapport aux recommandations fournisseur.

À l'issue du tri au demi, 2% des lymphocytes T CD4⁺ se retrouvent dans la fraction négative (*Tableau 5 (a)*) et ne sont donc pas triés, ce qui est concordant avec les résultats obtenus au préalable sur PBMC de sujet sain. À l'issue du tri au dixième, environ 1/5^{ème} (22%) des lymphocytes T CD4⁺ ne sont plus triés parmi lesquels figure un fort contingent de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ (*Tableau 5 (a)*). Au centième, on ne trie plus efficacement les lymphocytes T CD4⁺ puisque 70% des lymphocytes T CD4⁺ sont dans la fraction négative à l'issue du tri.

Après mise en culture des fractions positives issues de ces trois tris, nous avons à nouveau évalué le détachement des billes par passage sur le trieur de J2 à J4. Conformément aux résultats obtenus précédemment sur CMN de sujet sain, avec un tri au demi par rapport aux recommandations fournisseur, la proportion de billes

se détachant n'excède pas 10% quel que soit le nombre de jours en culture (2,3 ou 4) (*Tableau 5 (b)*). Après tri avec une concentration de billes au dixième, le détachement des billes est estimé à environ 40% des cellules introduites sur le trieur de J2 à J4 (*Tableau 5 (b)*) sans évolution en fonction du temps. Sur la fraction positive du tri au centième, le détachement des billes atteint 87% des cellules introduites sur le trieur dès J2 (*Tableau 5 (b)*). Cependant à cette concentration de billes, le tri CD4 est totalement inefficace.

1.2.3. Emploi d'un programme de tri plus sensible pour le tri CD4

Lors du tri avec une concentration de billes CD4 au dixième et un passage sur le trieur selon le programme recommandé « Possel », nous avons constaté un détachement des billes atteignant 40% à J2 de culture. Cependant, dans ces conditions, le tri CD4 était peu sensible, laissant passer 1/5^{ème} des T CD4⁺ dans la fraction négative.

Nous avons testé un tri CD4 au dixième (2 $\mu\text{L}/10^7$ CMN) sur échantillon de sang concentré en PBMC après Ficoll prélevé chez un nouveau volontaire sain avec un programme de tri plus sensible : « Possel-s » pour le tri CD4. Dans ces conditions, moins de 10% des lymphocytes T CD4⁺ échappent au tri et se retrouvent dans la fraction négative (*Tableau 5 (a)*). Cette approche (tri au dixième par rapport aux recommandations fournisseur et programme de tri « Possel-s ») a également été testée sur une CSP et montrait des résultats similaires avec 7% de lymphocytes T CD4⁺ passant dans la fraction négative (*Tableau 5 (a)*).

Pour l'évaluation du détachement des billes après mise en culture, nous avons gardé le programme « Possel » puisque, dans l'optique du tri CCR7 réalisé en second lieu, c'est ce programme qui doit être utilisé. De J1 à J3, on constate le détachement d'environ 50 à 55% des billes, indépendamment du délai de culture (*Tableau 5 (b)*).

Au vu de ces résultats, il semble donc que la culture ne joue pas un rôle déterminant pour le détachement des billes.

- **(a) Efficacité du tri** : % de cellules T récupérées dans les fractions positives et négatives après tri

Concentration de billes CD4 pour le tri	Tri 1/2		Tri 1/10		Tri 1/50		Tri 1/100	
Lymphocytes T CD4 ⁺	F +	F -	F +	F -	F +	F -	F +	F -
CSP 2 Pg Possel	68%	2%	45%	22%	nr	nr	2%	70%
CMN 2 Pg Possel-s	nr	nr	58%	9%	nr	nr	nr	nr
CSP3 Pg Possel-s	95%	0,4%	71%	7%	49%	28%	nr	nr

- **(b) Détachement des billes** (en fonction du temps)

Concentration de billes CD4		Tri 1/2		Tri 1/10		Tri 1/50		Tri 1/100	
Lymphocytes TCD4 ⁺		F +	F -	F +	F -	F +	F -	F +	F -
CSP 2 Pg Possel	J2	85%	7%	50%	36%	nr	nr	13%	87%
	J3	74%	9%	34%	38%	nr	nr	nr	nr
	J4	67%	11%	33%	45%	nr	nr	nr	nr
CMN 2 Pg Possel	J1	nr	nr	25%	50%	nr	nr	nr	nr
	J2	nr	nr	20%	54%	nr	nr	nr	nr
	J3	nr	nr	16%	57%	nr	nr	nr	nr
CSP3 Pg Possel	1 centrifugation et repassage immédiat	nr	nr	42%	24%	20%	49%	nr	nr
	1 centrifugation + 2h culture	nr	nr	34%	27%	16%	47%	nr	nr
	1 centrifugation + 2h culture + 2 ^{ème} centrifugation	nr	nr	17%	18%	8%	27%	nr	nr

Tableau 5 : Tri CD4 (a) Efficacité du tri CD4 réalisé à différentes concentrations de billes CD4 et avec différents programmes de tri : composition des fractions négatives et positives en T CD4⁺ à l'issue des tris par rapport à la quantité de T CD4⁺ initiale. (b) Évaluation du détachement des billes des fractions positives mises en culture par passage sur le trieur en Programme « Possel » chaque jour : composition des fractions négatives et positives en T CD4⁺ par rapport à la quantité de T CD4⁺ introduite sur le trieur chaque jour. (Pg : programme, F + : fraction positive, F - : fraction négative, nr : non réalisé)

1.2.4. Évaluation de la centrifugation dans le détachement des billes CD4 des lymphocytes T CD4⁺

Pour tenter d'améliorer le détachement des billes magnétiques, nous avons testé l'ajout, immédiatement après tri, d'une étape de centrifugation.

Sur une CSP, deux tris, au dixième ($2 \mu\text{L}/10^7$ CMN) et au cinquantième ($0,4 \mu\text{L}/10^7$ CMN) par rapport aux recommandations fournisseur, au programme « Possel-s », ont été réalisés. Après centrifugation de ces deux fractions positives et remise en suspension, celles-ci ont été repassées immédiatement sur le trieur ou mises en culture à l'étuve à 37°C . Au tri au dixième on constate un détachement de 24% des billes à l'issue d'une centrifugation et au cinquantième un détachement de près de 50% des billes (*Tableau 5 (b)*). Cependant le tri au cinquantième au programme « Possel-s » ne peut être retenu : près de 30% des lymphocytes T CD4⁺ n'étaient pas triés positivement (*Tableau 5 (a)*). Après deux heures de culture les fractions positives restantes étaient séparées en deux échantillons : un passé directement sur le trieur, l'autre centrifugé une nouvelle fois avant passage sur le trieur pour évaluer le détachement des billes. À l'issue des deux heures de culture sans centrifugation supplémentaire, on retrouve des proportions de cellules dans les fractions négatives similaires à celles obtenues immédiatement après première centrifugation, respectivement 27 et 47% pour le tri au dixième et au cinquantième (*Tableau 5 (b)*). En revanche suite aux 2 heures de culture associées à une centrifugation supplémentaire les proportions de cellules aussi bien dans les fractions positives que négatives chutent considérablement par rapport à la quantité théorique initiale de cellules introduites sur le trieur (tri au dixième : fraction positive : 17%, fraction négative : 18% ; tri au cinquantième : fraction positive : 8%, fraction négative : 27%) (*Tableau 5 (b)*). Il apparaît que les centrifugations répétées altèrent de manière importante les cellules.

Il existe une alternative pour détacher les billes CD4 qui n'a pas été testée dans le contexte de ce travail. En effet, une enzyme commercialisée par Miltenyi Biotec clive la bille cependant son utilisation en clinique est impossible car l'échantillon ainsi traité ne peut être réinjecté chez l'homme.

Le constat d'un détachement insuffisant des billes des cellules CD4⁺ écarte la possibilité d'un second tri CCR7 sur la fraction positive en l'état. En effet, la colonne du trieur donc le champ magnétique, ne peut discerner des billes CD4 et des billes

associées aux anticorps anti-CCR7 et par conséquent, les cellules CD4⁺ CCR7⁻ et CD4⁺ CCR7⁺ vont se retrouver dans la fraction positive sans avoir été triées.

1.3. Nouvelle stratégie pour optimiser le double tri positif CD4 CCR7 : tri simultané des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺

Notre raisonnement était basé sur l'emploi de concentrations suboptimales en billes couplées aux anticorps, telles que les cellules recouvertes d'une seule catégorie de billes ne soient pas triées mais qu'en revanche, les cellules doublement marquées par les deux types de billes soient triées.

Nous avons donc évalué dans un premier temps le tri CCR7 et, dans un second temps, testé des tris avec des gammes de concentrations en billes CD4, et des gammes de concentrations en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes anti-biotine.

1.3.1. Le tri CCR7

Cette stratégie nous a conduits à identifier toutes les cellules exprimant le CCR7 et qui risqueraient d'être triées malgré l'objectif du double tri simultané.

Nous avons recherché l'expression du CCR7 en cytométrie sur les lymphocytes T, les lymphocytes B, les lymphocytes NK, les monocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules progénitrices CD34⁺ d'une CSP. La majorité des lymphocytes T expriment le marqueur CCR7 de façon importante (*Figure 19 (d)*) alors que les lymphocytes NK présentent une expression faible du CCR7 pour les 3/4 d'entre eux (*Figure 19 (f)*). Les lymphocytes B, quant à eux, pour la quasi-totalité (94%) ont une expression intermédiaire du CCR7 (*Figure 19 (e)*). À l'inverse, les PNN (*Figure 19 (a) et (b)*), les monocytes (*Figure 19 (a) et (c)*) et les cellules progénitrices CD34⁺ (*Figure 20 (c) et (d)*) n'expriment pas CCR7 à leur surface.

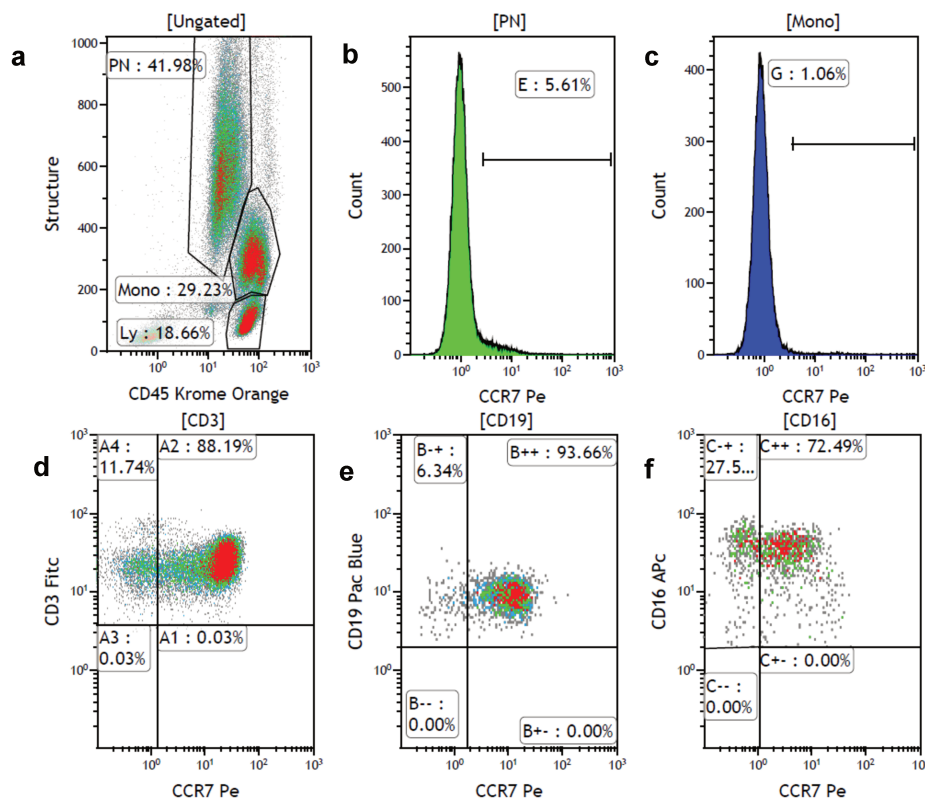


Figure 19 : (a) Répartition des différentes populations leucocytaires d'une CSP selon la structure et le marqueur CD45 par cytométrie en flux. (b) Expression du marqueur CCR7 par les PNN. (c) Expression du marqueur CCR7 par les monocytes. (d) Expression du marqueur CCR7 par les lymphocytes T. (e) Expression du marqueur CCR7 par les lymphocytes B. (f) Expression du marqueur CCR7 par les lymphocytes NK.

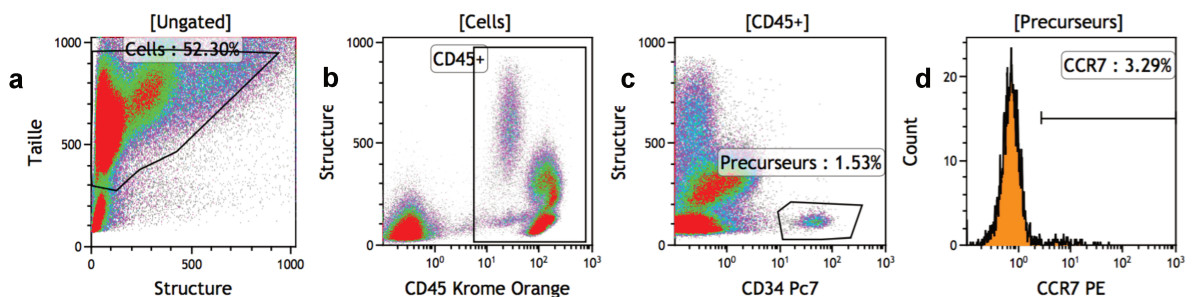


Figure 20 : (a) Diagramme taille-structure des cellules composant une CSP par cytométrie en flux. (b) Répartition des leucocytes de la CSP selon la structure et le marqueur CD45. (c) Gating des cellules progénitrices CD34⁺ parmi l'ensemble des leucocytes. (d) Expression du marqueur CCR7 par les cellules progénitrices CD34⁺.

Nous avons procédé également à un tri isolé CCR7 pour connaître les populations capables d'être captées par le tri CCR7. Le tri CCR7, tri indirect, utilisé aux recommandations fournisseur (10 µL d'anti-CCR7 biotinylé/10⁷ CMN, 20 µL de billes anti-biotine/10⁷ CMN, programme de tri : « Possel ») est sensible puisqu'après tri, dans la fraction négative, seuls 1,1% des lymphocytes T sont CCR7⁺. Le tri est également assez spécifique dans ces conditions, puisqu'on retrouve dans la fraction positive presque 90% des lymphocytes exprimant CCR7. Les lymphocytes NK,

malgré leur faible expression en CCR7 ne sont pas triés puisqu'on retrouve moins de 1% des NK dans la fraction positive à l'issue du tri (*Tableau 6*). Cependant tous les NK ne se retrouvent pas dans la fraction négative, avec vraisemblablement des pertes certaines liées à la centrifugation. En revanche les lymphocytes B, dont l'expression en CCR7 est d'intensité intermédiaire, sont triés positivement (pour 1/3 à la moitié d'entre eux) (*Tableau 6*). Les cellules progénitrices CD34⁺, n'exprimant pas le marqueur CCR7, ne sont quant à elles, pas triées par le tri CCR7 aux conditions fournisseur (*Tableau 6*).

CSP 4 Programme Possel	Fraction positive	Fraction négative
T CD4 ⁺ (% par rapport aux T CD4 ⁺ théoriques)	63%	9%
T CD8 ⁺ (% par rapport aux T CD8 ⁺ théoriques)	45%	24%
B (% par rapport aux B théoriques)	45%	29%
NK (% par rapport aux NK théoriques)	0,4%	46%
CD34 ⁺ (% par rapport aux CD34 ⁺ théoriques)	4%	42%

Tableau 6 : Composition des différentes fractions positive et négative par rapport à la CSP non manipulée après tri simple CCR7 aux recommandations fournisseur sur une CSP.

1.3.2. Choix des concentrations pour le tri simultané CD4 CCR7

Le tri CD4 au cinquantième programme « Possel-s », utilisé seul, trie de manière incomplète les lymphocytes T CD4⁺ puisqu'il laisse environ 30% des lymphocytes T CD4⁺ dans la fraction négative. Nous avons donc choisi cette concentration en billes CD4 pour le tri simultané CD4 CCR7. Concernant le tri CCR7, deux paramètres peuvent être modifiés de façon simultanée : la concentration en anticorps anti-CCR7 biotinylés et la concentration en billes couplées à l'anti-biotine. Nous avons décidé de les faire varier de façon coordonnée et avons réalisé une gamme avec concentrations au demi, au dixième et au cinquantième par rapport aux recommandations fournisseur. À l'issue de ces essais, nous avons choisi d'utiliser une concentration au dixième en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes couplées à l'anti-biotine par rapport aux recommandations fournisseur pour le tri simultané CD4 CCR7.

1.3.3. Résultats du tri simultané CD4 (1/50^{ème}) CCR7 (1/10^{ème}) programme « Possel-s »

À l'issue du tri simultané CD4 (billes au cinquantième) et CCR7 (concentrations au dixième) avec le programme « Possel-s », nous avons caractérisé la fraction négative, fraction qui devrait être réinjectée au receveur dans l'optique

d'une greffe haploidentique partiellement déplétée en cellules T CD4⁺ CCR7⁺. Notre objectif est donc de conserver toutes les cellules de la CSP à l'exception des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺.

Initialement la CSP présente au sein de ces lymphocytes T CD4⁺ 15% de cellules CCR7⁻ et 85% de CCR7⁺. À l'issue du tri, dans la fraction négative on retrouve environ 70% de T CD4⁺ CCR7⁻ et 30% de T CD4⁺ CCR7⁺ (Figure 21 (a)). Cet équilibre est acceptable puisque l'on répond au critère attendu, à savoir moins de 50% de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans la fraction négative destinée à être réinjectée au patient. Dans la fraction positive de cette CSP triée, 99% des lymphocytes T CD4⁺ sont CCR7⁺.

Toutefois, le tri simultané emporte dans la fraction positive une proportion non négligeable de lymphocytes T CD8⁺ (42%) et de lymphocytes B (37%) (Figure 21 (b)), cellules que l'on souhaiterait injecter au receveur. L'élimination dans la fraction positive des lymphocytes T CD8⁺ CCR7⁺ n'est pas surprenante puisque nous avons constaté que le tri CCR7 isolé fonctionnait mieux sur les lymphocytes T CD8⁺ CCR7⁺, ceux-ci ayant une densité d'expression du marqueur CCR7 plus forte que les T CD4⁺ CCR7⁺. Lors du tri CCR7 isolé, il reste moins de 2% de lymphocytes T CD8⁺ exprimant le CCR7 dans la fraction négative contre presque 10% de lymphocytes T CD4⁺ exprimant le marqueur CCR7. Cette différence persiste lors du tri simultané CD4 CCR7 et ceci malgré l'addition de billes CD4.

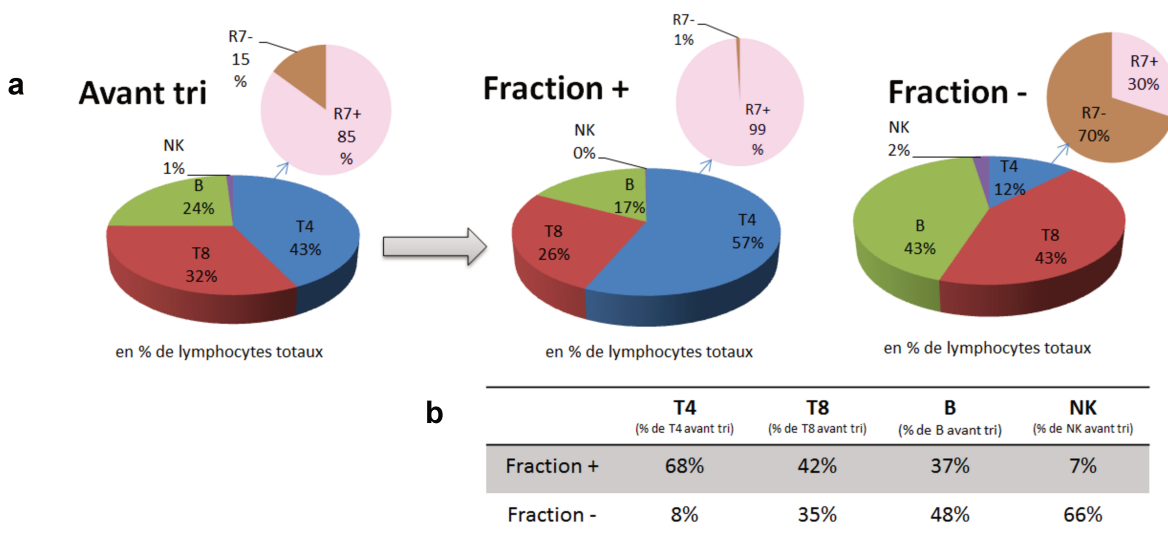


Figure 21 : (a) Représentation des proportions de la composition lymphocytaire de la CSP avant et après le tri simultané CD4⁺ CCR7⁺. (b) Proportion des différentes populations lymphocytaires dans chaque fraction après tri simultané CD4⁺ CCR7⁺ par rapport à la quantité avant tri.

Au total, l'ensemble des manipulations destinées à dépléter un greffon de CSP en cellules T CD4⁺ CCR7⁺ à partir de l'usage de billes CD4 et de billes associées aux anticorps anti-CCR7 n'a pas abouti à des résultats permettant d'envisager une transposition clinique de la procédure. En effet, nous nous retrouvons face à une impasse puisque si l'on diminue les concentrations en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes anti-biotine pour éliminer moins de lymphocytes T CD8⁺ et B dans la fraction positive, on risque de laisser passer plus de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans la fraction négative, cellules que l'on souhaite éliminer. À l'inverse, si on augmente les concentrations pour réduire encore la proportion de cellules T CD4⁺ CCR7⁺ dans la fraction négative, on va capter plus de T CD8⁺ et de B dans la fraction positive.

Ceci nous a contraints à envisager de nouvelles stratégies totalement différentes pour parvenir à dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ des greffons haploidentiques.

2. Deuxième stratégie : tri CD8 associé à un tri CCR7 sur la fraction négative

2.1. Concept

Il s'agit de mettre en œuvre un premier tri CD8, suivi d'un deuxième tri CCR7 sur la fraction déplétée en cellules T CD8⁺. Le tri CD8 permet de préserver la totalité des lymphocytes T CD8⁺ qui seront à injecter au receveur. Les lymphocytes T CD4⁺ sont contenus dans la fraction négative à l'issue du premier tri CD8. La fraction négative fait l'objet d'un deuxième tri CCR7. Celui-ci peut être réalisé d'emblée sans étape de culture pour un éventuel détachement des billes puisqu'on part de la fraction négative. À l'issue du deuxième tri, l'objectif est de réinjecter la fraction négative au malade en même temps que la fraction positive CD8⁺ issue du premier tri.

Cette nouvelle stratégie présente l'intérêt majeur d'une possible réinjection simultanée de l'ensemble des cellules au malade à J0. Cela nous permet de contourner les problèmes liés à la culture et au risque d'injection concomitante d'Endoxan[®].

En revanche, cette stratégie pose le problème des cellules, autres que les lymphocytes T CD4⁺, exprimant le CCR7 et risquant donc d'être éliminées par le second tri. Le marquage CCR7 en cytométrie de l'ensemble des cellules et les

premiers essais de tri CCR7 aux conditions fournisseur (10 μ L d'anti-CCR7 biotinylé/ 10^7 CMN, 20 μ L de billes anti-biotine/ 10^7 CMN, programme de tri : « Possel ») nous avaient apporté des premiers éléments de réponse. Les lymphocytes NK, bien qu'exprimant pour la plupart faiblement le CCR7 n'étaient pas triés, et il est possible qu'une proportion non négligeable de NK soit retenue par un premier tri CD8 puisque ces cellules sont susceptibles d'exprimer le marqueur CD8. Les lymphocytes B étaient partiellement triés par le tri CCR7. Les cellules progénitrices CD34⁺ ne sont, quant à elles, pas impactées par le tri CCR7 puisqu'elles n'expriment pas le marqueur CCR7 à leur surface.

2.2. Évaluation du tri CD8

De par l'expérience acquise avec le tri CD4, nous avons d'emblée testé un tri CD8 au demi par rapport aux recommandations fournisseur (10 μ L billes CD8/ 10^7 CMN), programme « Possel ». Dans ces conditions, 16% de nos lymphocytes T CD8⁺ se retrouvaient dans la fraction négative. Ce résultat n'étant pas satisfaisant, nous avons opté pour un tri CD8 avec concentrations conformes aux recommandations fournisseur (20 μ L billes/ 10^7 CMN). Comme 12% de nos lymphocytes T CD8⁺ initiaux se retrouvaient cette fois dans la fraction négative, nous avons à nouveau évalué la performance du tri avec le programme « Possel-s », utilisé avec des concentrations en billes CD8 au demi par rapport aux recommandations fournisseur (10 μ L billes/ 10^7 CMN). Cette fois les résultats sont acceptables puisque seul 1% de nos lymphocytes T CD8⁺ initiaux ne sont pas triés par le tri CD8.

2.3. Tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8

Le premier tri CD8 étant concluant, nous avons procédé au tri CCR7 sur la fraction négative du tri CD8 dans l'optique d'en éliminer les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺. Nous avons décidé de réaliser un tri CCR7 dans les conditions fournisseur, programme « Possel », tri antérieurement testé qui présente l'inconvénient d'éliminer une part non négligeable de lymphocytes B et, un tri CCR7 au demi par rapport aux recommandations fournisseur.

2.3.1. Résultats du tri CCR7 aux recommandations fournisseur suite au tri CD8

À l'issue du tri CCR7, près de la moitié des lymphocytes B (*Tableau 7*), comme attendu, se retrouvaient dans la fraction positive et étaient donc potentiellement perdus pour la greffe. Nous avons recherché si certaines sous-

populations sont davantage triées dans le tri CCR7. Il s'avère que toutes les sous-populations B expriment CCR7 de façon uniforme (Figure 22 (a)) et la répartition des différentes sous-populations dans la fraction positive à l'issue du tri n'est quasiment pas modifiée par rapport à l'échantillon de CSP non trié (Figure 22 (b)).

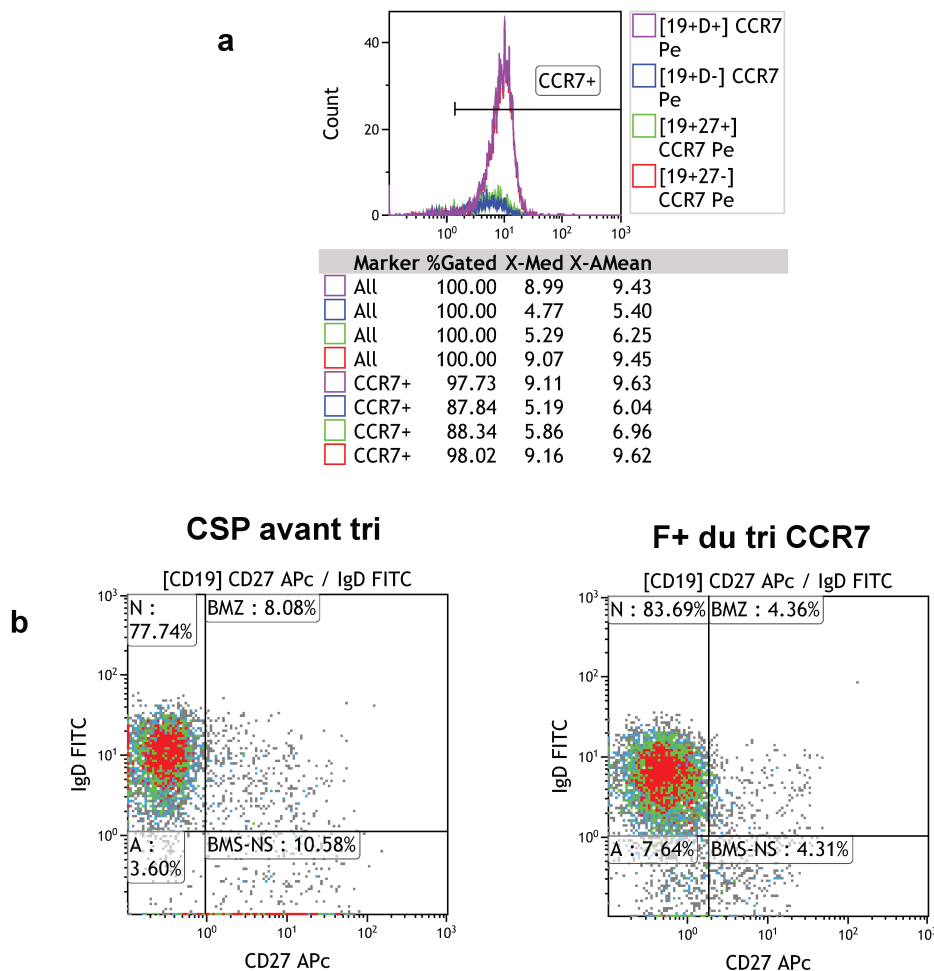


Figure 22 : Étude des sous-populations lymphocytaires B (a) Expression du marqueur CCR7 par les différentes sous-populations B dans un échantillon de CSP non trié (b) Comparaison de la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires B dans une CSP avant toute étape de tri et dans la fraction positive à l'issue d'un tri CCR7. (F+ : fraction positive, N : B Naïfs, $CD19^+ CD27^- IgD^+$, BMZ : B de la Zone Marginale, $CD19^+ CD27^+ IgD^+$, BMS-NS : B Mémoires Switchés et Non Switchés, $CD19^+ CD27^+ IgD^-$)

En ce qui concerne les lymphocytes T $CD4^+$, à l'issue du tri CCR7 dans les conditions fournisseur, la majorité des lymphocytes T $CD4^+$ était triée positivement (85% des T $CD4^+$ de la fraction négative du tri CD8) (Tableau 7).

Toutefois, dans la fraction négative du tri CCR7 réalisé aux conditions fournisseur, il persiste près de 26% de lymphocytes T $CD4^+$ exprimant CCR7 (Tableau 7). Cette fraction est destinée à être injectée au receveur en complément des cellules T $CD8^+$. Ce résultat reste conforme à nos exigences de diminuer la part des T $CD4^+ CCR7^+$ en dessous de 50% de l'ensemble des T $CD4^+$.

		T CD4⁺ (% de T CD4 ⁺ dans fraction – du tri CD8)	B (% de B dans fraction – du tri CD8)	NK (% de NK dans fraction – du tri CD8)	CCR7⁺ (% sur T CD4 ⁺)
Pur	Fraction +	85%	45%	3%	94%
	Fraction -	11%	35%	41%	26%
1/2	Fraction +	45%	20%	1%	97%
	Fraction -	24%	44%	37%	62%

Tableau 7 : Composition des différentes fractions positives et négatives issues des tris CCR7 réalisés sur la fraction négative du tri CD8. Tris CCR7 réalisés aux recommandations fournisseur et au demi sur une CSP.

2.3.2. Résultats du tri CCR7 au demi par rapport aux recommandations fournisseur suite au tri CD8

Suite au tri CCR7 au demi par rapport aux recommandations fournisseur, programme « Possel » réalisé sur la fraction négative du tri CD8, comme attendu moins de lymphocytes B sont triés puisque seuls 20% (Tableau 7) contre 45% pour le tri aux recommandations fournisseur se retrouvent dans la fraction positive et sont donc perdus pour la greffe.

Cependant le tri CCR7 dans ces conditions fonctionne moins bien puisqu'on retrouve une proportion prohibitive de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans la fraction négative, à savoir 62% (Tableau 7).

2.4. Optimisation du tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8 en vue de minimiser la perte des lymphocytes B

Afin de tester de nouvelles conditions pour le tri CCR7, deux CSP ont été utilisées. Le tri CD8 a été à nouveau utilisé avec des concentrations en billes au demi par rapport aux recommandations fournisseur, programme de tri « Possel-s » sur les échantillons. On récupère respectivement 91% et 84% de lymphocytes T CD8⁺ dans les fractions positives (Tableau 8) à l'issue des deux tris CD8 permettant ainsi de préserver immédiatement les lymphocytes T CD8⁺ dans l'idée d'une réinjection future. Le tri CD8 est donc efficace, cela permet de valider l'utilisation du tri CD8 dans ces conditions. À noter que l'on préserve également immédiatement dans les fractions positives une part non négligeable des lymphocytes NK (respectivement 23% et 17%) (Tableau 8). Ceci n'est pas surprenant car une part des lymphocytes NK exprime le marqueur CD8. Enfin la majeure partie des T CD4⁺ (76% et 81%) persiste bien dans la fraction négative à l'issue de ce tri CD8.

		T CD4⁺ (% par rapport aux T4 initiaux)	T CD8⁺ (% par rapport aux T8 initiaux)	B (% par rapport aux B initiaux)	NK (% par rapport aux NK initiaux)
CSP6	Fraction +	5,8% (dont 5% de triple +)	91%	4,6%	23%
	Fraction -	76%	2,2%	74%	72%
CSP7	Fraction +	2,1%	84%	3,1%	17%
	Fraction -	81%	1,6%	83%	70%

Tableau 8 : Composition des différentes fractions positives et négatives par rapport aux CSP initiales à l'issue du tri CD8 au demi par rapport aux recommandations fournisseur, Programme « Possel-s » sur deux CSP, évaluant l'efficacité de ce dernier. Les lymphocytes « triples positifs » sont CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺, leur proportion dans les échantillons est faible.

Suite à cela, les fractions négatives des 2 CSP, issues des tris CD8, ont été récupérées et divisées afin de réaliser les tris CCR7 dans différentes conditions : programme « Possel » ou « Deplete » et concentrations en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes anti-biotine conformes aux recommandations fournisseur ; programme « Possel-s » et concentrations en anticorps anti-CCR7 biotinylés et en billes anti-biotine au demi par rapport aux recommandations fournisseur ; programme « Possel-s » et concentrations en réactifs au quart par rapport aux recommandations. L'objectif est d'essayer de minimiser la perte de B avec au moins l'une de ces conditions.

Le programme « Deplete », testé sur la CSP6, a pour objectif d'améliorer le rendement de la fraction négative. Cependant, nos résultats montrent qu'il ne modifie pas ceux obtenus avec le programme « Possel », en particulier la proportion de cellules B captées par les billes du tri CCR7 (60% en conditions « Possel »/57% en conditions « Deplete ») (Tableau 9). Son utilisation a donc été abandonnée par la suite.

En ce qui concerne les proportions des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans les fractions négatives à l'issue du tri CCR7, elles sont toutes bien inférieures à 73,5%, critère retenu dans la publication de l'équipe (78) pour réduire le risque de GVH aiguë après allogreffe HLA-identique (Tableau 9).

Dans le cas d'une allogreffe haploidentique, la proportion de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ à l'issue du tri CCR7 doit être la plus faible possible. Avec respectivement 8,4% et 13% de lymphocytes T CD4⁺ exprimant CCR7 dans les fractions négatives des CSP6 et 7 (Tableau 9), c'est la condition au demi par rapport

aux recommandations fournisseur et programme « Possel-s » qui est la plus performante. La condition : programme « Possel » avec concentrations standards est néanmoins acceptable avec des proportions en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans les fractions négatives respectivement de 33% et 27% pour les CSP6 et 7. L'analyse des sous-populations T CD4⁺ montre que les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ présents dans les fractions négatives sont en majorité des lymphocytes T CD4⁺ centraux mémoires. Ceci suggère que le tri CCR7 est plus efficace sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, ayant une expression plus forte du CCR7.

		CSP6				CSP7			
		T4 (% de T4 dans fraction - du tri 8)	B (% de B dans fraction - du tri 8)	NK (% de NK dans fraction - du tri 8)	CCR7 ⁺ (% sur T4)	T4 (% de T4 dans fraction - du tri 8)	B (% de B dans fraction - du tri 8)	NK (% de NK dans fraction - du tri 8)	CCR7 ⁺ (% sur T4)
Pg Possel	Pur Fraction +	67%	60%	2%	93%	58%	39%	1%	90%
	Fraction -	15%	31%	90%	33%	18%	28%	32%	27%
Pg Deplete	Pur Fraction +	63%	57%	2%	94%	nr	nr	nr	nr
	Fraction -	18%	34%	93%	35%	nr	nr	nr	nr
Pg Possel-s	1/2 Fraction +	67%	76%	10%	93%	64%	57%	8%	87%
	Fraction -	8%	12%	71%	8,4%	13%	18%	56%	13%
Pg Possel-s	1/4 Fraction +	63%	62%	9%	85%	47%	36%	7%	92%
	Fraction -	15%	27%	78%	22%	22%	32%	79%	28%

Tableau 9 : Comparaison de la composition des différentes fractions positives et négatives à l'issue du tri CCR7 utilisé avec différents programmes et concentrations en réactifs sur deux fractions négatives de CSP récupérées à l'issue d'un premier tri CD8.

Les lymphocytes B, dont la proportion est élevée dans les différentes fractions positives, ont été entourés en rouge. Les proportions de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans les fractions négatives par rapport à l'ensemble des T CD4⁺ restants ont été marquées par un dégradé de couleurs (vert, jaune, orange) allant de la proportion de ces cellules la plus faible à la plus élevée. (Pg : programme, nr : non réalisé)

Les proportions de lymphocytes NK dans les fractions négatives à l'issue des différents tris CCR7 sont parfois anormalement faibles (32%, 56%) alors que ceux-ci ne sont en principe pas triés par le tri CCR7 (*Tableau 9*). Ceci est en fait dû aux difficultés de leur phénotypage après tri (présence de monocytes à structure proche des cellules NK après tri).

Au terme de ces différents essais, on constate que, quelle que soit la condition utilisée (concentration + programme), les proportions de lymphocytes B à l'issue des tris CCR7 dans les fractions positives restent très importantes. Aucune condition ne permet de minimiser leur tri positif (*Figure 23*). Ceci ne répond pas à nos critères initiaux de préservation de l'ensemble des populations cellulaires à l'exception des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ à l'issue de notre stratégie de tri.

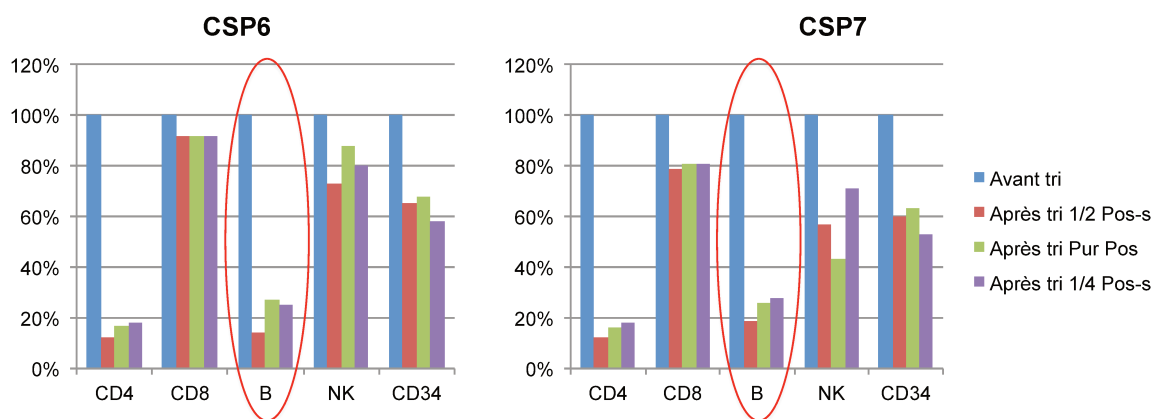


Figure 23 : Proportion des différentes populations cellulaires dans 2 CSP à l'issue des deux tris CD8 et CCR7, ce dernier ayant été utilisé avec différents programmes de tris et concentrations en réactifs. (Pos : programme « Possel » et Pos-s : programme « Possel-s »)

Confrontés à ce problème de perte des lymphocytes B, nous avons envisagé la réalisation d'un premier tri conjoint, CD8 et B.

3. Stratégie retenue : deux tris successifs avec premier tri CD8-CD19 puis tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri

3.1. Évaluation des tris CD8 et CD19 simultanés

Afin d'éviter la perte des lymphocytes B dans le tri CCR7, nous avons décidé de réaliser un tri CD8 et CD19 en un temps. La réalisation d'un double tri simultané a été privilégiée afin d'éviter la multiplication des étapes de lavages, de centrifugations et donc les pertes cellulaires.

Nous avons opté d'emblée vers un tri simultané CD8-CD19 aux recommandations fournisseur (20 μ L billes CD8/10⁷ CMN et 20 μ L billes CD19/10⁷ CMN) associé au programme plus sensible : « Possel-s ».

À ce stade de notre projet, les discussions avec le fournisseur Miltenyi Biotec nous ont conduits à ne plus réaliser d'essais avec des concentrations réduites. Les billes CD8 et les billes CD19 ont déjà un grade clinique et leurs conditionnements sont d'ores et déjà fixés. Étant donné qu'un flacon de billes est totalement dédié au traitement de la poche d'un donneur, l'usage d'une quantité réduite de billes pour diminuer le coût d'un tri n'est pas envisageable.

		T CD4⁺ (% par rapport aux T4 initiaux)	T CD8⁺ (% par rapport aux T8 initiaux)	B (% par rapport aux B initiaux)	NK (% par rapport aux NK initiaux)
CSP8	Fraction +	0,5%	84%	82%	10%
	Fraction -	67%	0,2%	0,8%	79%
CSP9	Fraction +	1,6%	78%	88%	30%
	Fraction -	78%	0,7%	1,2%	58%

Tableau 10 : Rendements du tri simultané CD8-CD19, aux recommandations fournisseur, programme « Possel-s » sur 2 CSP montrant son efficacité quant aux proportions des différentes populations leucocytaires dans les fractions positives et négatives.

Le tri simultané CD8-CD19 a été pratiqué sur deux CSP différentes. Le tri simultané CD8-CD19 aux recommandations fournisseur, programme « Possel-s » est efficace puisque nous récupérons plus de 75% des lymphocytes T CD8⁺ (respectivement 84% et 78% pour les CSP8 et 9) et des lymphocytes B (respectivement 82% et 88% pour les CSP8 et 9) dans les fractions positives à l'issue de ce tri (*Tableau 10*). Grâce au tri simultané CD8-CD19, nous avons donc résolu le problème posé par la perte des lymphocytes B lors du second tri CCR7. Ces cellules triées positivement sont destinées à être injectées au receveur lors de la greffe haploidentique.

De plus, comme dans les manipulations précédentes nous récupérons dans la fraction positive du tri CD8-CD19, une proportion de lymphocytes NK variable suivant les échantillons (10% lors de la CSP8 contre 30% lors de la CSP9) (*Tableau 10*), permettant ainsi de préserver d'emblée une partie des NK.

Enfin, la majorité des lymphocytes T CD4⁺ se retrouve bien dans la fraction négative à l'issue du tri simultané CD8-CD19 (Tableau 10).

3.2. Le tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri CD8-CD19

Pour ce tri CCR7, les dilutions des anticorps anti-CCR7 biotinylés et des billes anti-biotine ont aussi été abandonnées. Nous avons en revanche comparé les programmes « Possel » et « Possel-s » sur la CSP9.

Rappelons que notre objectif à l'issue de notre stratégie de déplétion est de conserver toutes les populations cellulaires à hauteur d'au moins 70% à l'exception des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺.

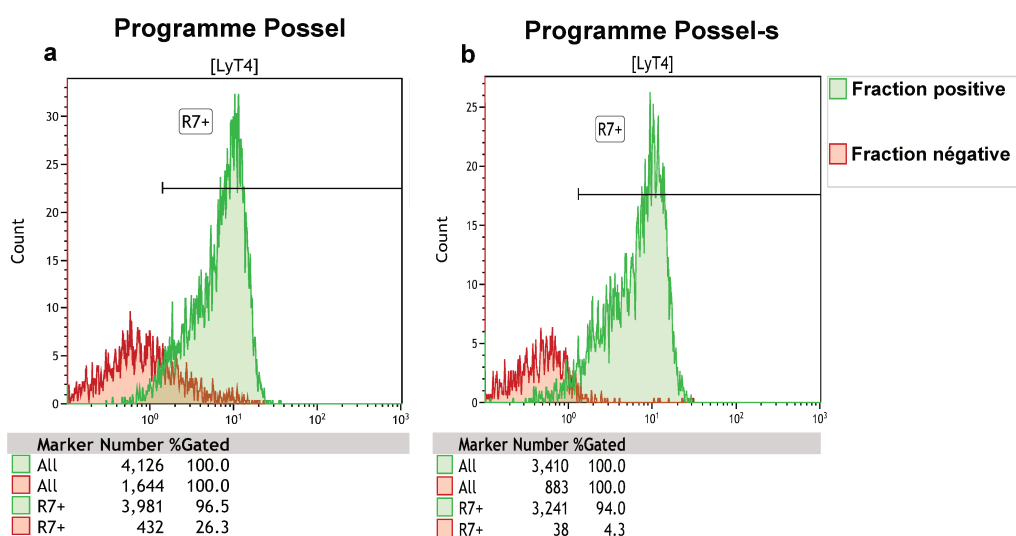


Figure 24 : Expression du marqueur CCR7 par les lymphocytes T CD4⁺ dans les deux fractions positive et négative obtenues après réalisation d'un tri CCR7 sur la fraction négative résultant du tri simultané CD8-CD19 (a) au Programme « Possel » et (b) Programme « Possel-s ».

Le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ exprimant le marqueur CCR7 dans la fraction négative est plus élevé avec le programme « Possel » (26% contre 4,3% et 1% avec le programme « Possel-s ») (Figure 24, Tableau 11). Pour autant, cela reste conforme nos exigences. Notre choix s'est finalement porté sur le programme « Possel » car il permettra de réinjecter un petit contingent de lymphocytes T CD4⁺ potentiellement alloréactifs (13% contre 6,6% avec le programme « Possel-s ») et il optimise la préservation des lymphocytes NK.

			T CD4⁺ (% de T4 dans fraction – du tri 8 et 19)	TCD4⁺ (% de T4 initiaux)	NK (% de NK dans fraction – du tri 8 et 19)	NK (% de NK initiaux)	CCR7⁺ (% sur T4)
CSP8	Pg Possel-s	Fraction +	65%	43%	3,7%	2,9%	82%
		Fraction -	12%	8,4%	72%	57%	1%
CSP9	Pg Possel	Fraction +	60%	47%	1%	0,6%	97%
		Fraction -	16%	13%	98%	57%	26%
	Pg Possel-s	Fraction +	70%	55%	3%	1,7%	94%
		Fraction -	8,4%	6,6%	46%	26%	4,3%

Tableau 11 : Proportions des populations lymphocytaires T CD4⁺ et NK dans les fractions positives et négatives suite au tri CCR7 réalisé sur la fraction négative issue du tri simultané CD8-CD19 par rapport aux T CD4⁺ et NK dans la fraction négative du tri simultané et par rapport aux T CD4⁺ et NK initiaux et proportions de lymphocytes T CD4⁺ exprimant CCR7 dans les différentes fractions suite au tri CCR7.

3.3. Caractéristiques globales du greffon après les deux étapes de tri (CD8-CD19 puis CCR7)

Lorsqu'on fusionne la fraction positive du tri simultané CD8-CD19 et la fraction négative du tri CCR7, on confirme les résultats en matière de proportions de cellules. Ces valeurs correspondent au traitement d'un échantillon de 1 mL d'une poche de CSP (Figure 25).

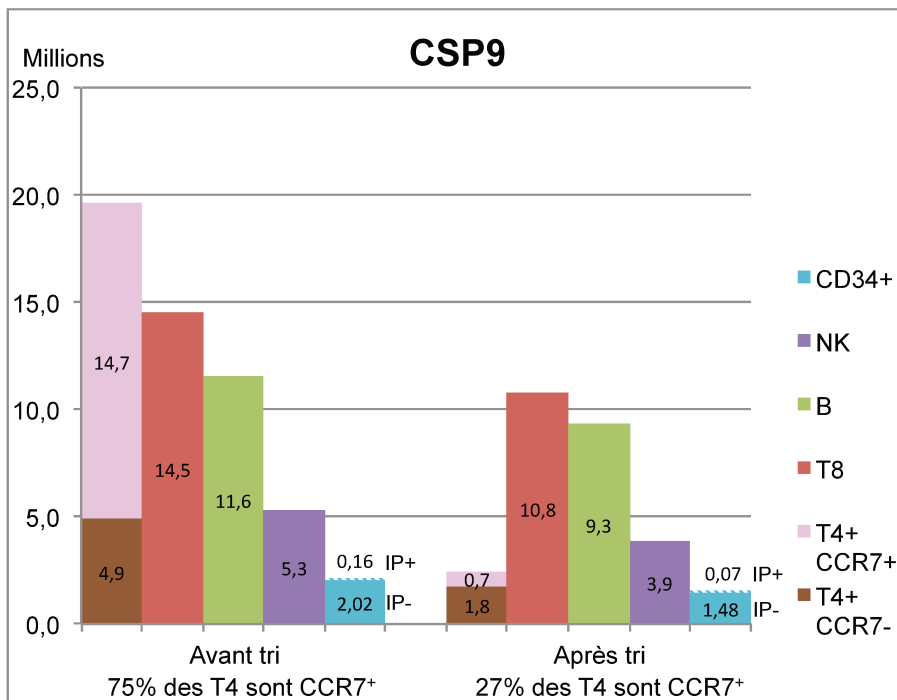


Figure 25 : Composition cellulaire d'un échantillon de 1 mL de CSP avant et après traitement par la stratégie de tri choisie : tri CD8-CD19, programme « Possel-s » puis tri CCR7, programme « Possel ».

Après avoir simulé la reconstitution d'un échantillon de 1 mL de CSP avec la stratégie de tri choisie, nous avons extrapolé ces données à la totalité de la poche de la CSP9 (Figure 26). Ceci a été possible car nous disposons des informations concernant le volume prélevé de la poche (CSP9), à savoir 292 mL ainsi que le poids du malade l'ayant reçu (67 kg). Ainsi nous aurions pu réinjecter théoriquement 47.10^6 T CD8⁺/kg, 41.10^6 B/kg, 17.10^6 NK/kg et $6,4.10^6$ CD34⁺ IP⁻/kg à l'issue du protocole de tri. Ces quantités sont proches de celles disponibles dans la poche avant tri à l'exception des lymphocytes T CD4⁺ (11.10^6 T CD4⁺/kg) pour lesquels nous avons déplété la majorité des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ (Figure 26).

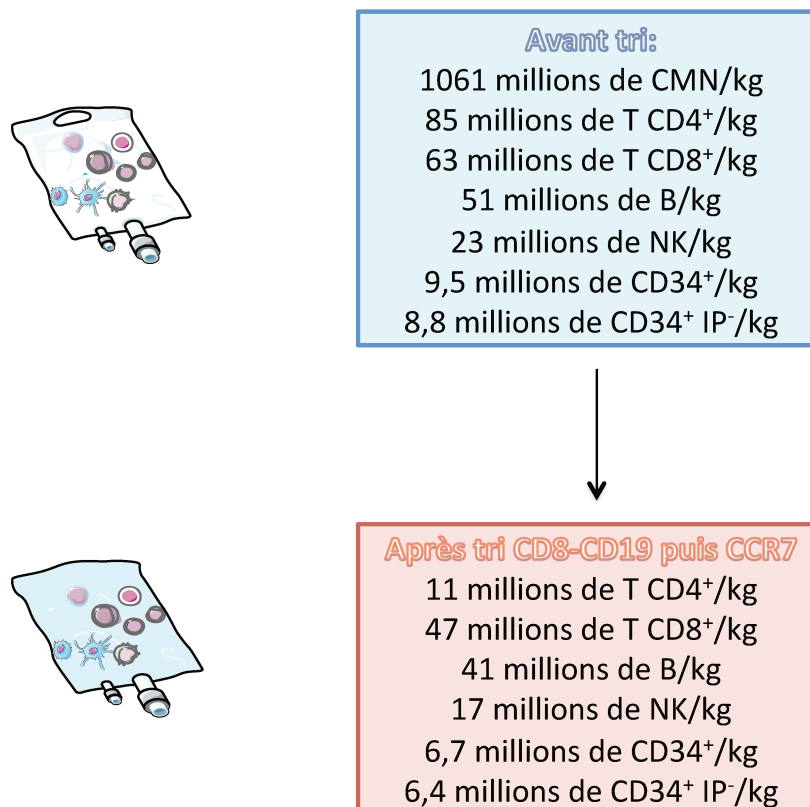


Figure 26 : Composition de la poche avant tri et après la stratégie de tri choisie pour dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ (à savoir tri CD8-CD19 simultané puis tri CCR7 sur la fraction négative issue du tri simultané) rapporté au volume total de la poche et au poids du patient greffé à partir de cette CSP.

Enfin, si on s'intéresse aux rendements des différentes populations cellulaires à l'issue de la stratégie de tri choisie pour dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺, on peut conclure que nos objectifs sont atteints : plus de 70% pour l'ensemble des populations cellulaires (T CD8⁺, B, NK, CD34⁺) (Figure 27). La population ciblée par notre stratégie de tri est déplétée à hauteur de 95% ($14,7 \cdot 10^6$ T CD4⁺ CCR7⁺/mL dans l'échantillon avant tri et $0,7 \cdot 10^6$ T CD4⁺ CCR7⁺/mL après tri) (Figure 25), ce qui satisfait notre critère de déplétion d'au moins 80% des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺.

On aurait pu s'attendre à une concentration de $4,9 \cdot 10^6$ /mL en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁻ dans l'échantillon après tri or elle n'est que de $1,8 \cdot 10^6$ /mL (Figure 25). Ceci s'explique par le fait que les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁻ sont les cellules les plus fragiles et que les pertes générées par les multiples étapes de tris, centrifugations et lavages sont importantes. Il sera difficile de faire mieux en matière de préservation de ces cellules, leur fragilité ayant déjà été constatée au préalable par l'équipe. Cependant, on conserve un pourcentage de cellules T CD4⁺ CCR7⁻ suffisant pour que ces cellules assurent leur rôle.

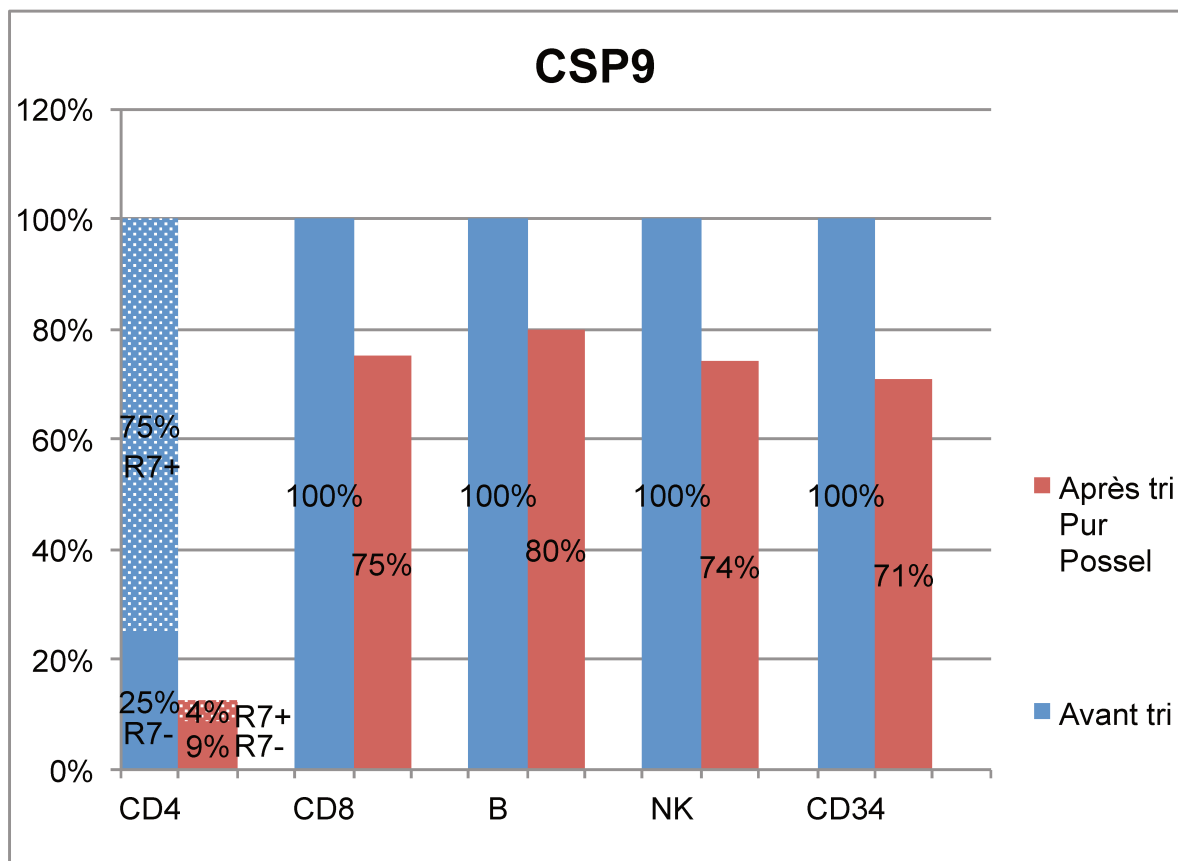


Figure 27 : Rendements des différentes populations cellulaires à l'issue de la stratégie de tri choisie pour dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺, à savoir tri simultané CD8-CD19, programme « Possel-s » puis tri CCR7, programme « Possel » sur la fraction négative issue du tri simultané.

Nous avons également évalué la viabilité des cellules progénitrices CD34⁺ grâce à l'iodure de propidium, les cellules vivantes étant IP⁻, car il est indispensable de réinjecter des cellules fonctionnelles. La proportion de cellules progénitrices CD34⁺ IP⁺ donc mortes diminue à l'issue de la stratégie de tri ($0,07 \cdot 10^6/\text{mL}$ CD34⁺ IP⁺ contre $0,16 \cdot 10^6/\text{mL}$ CD34⁺ IP⁺ avant tri (Figure 25)), ces dernières étant éliminées plus facilement lors des étapes de lavage. À l'issue de notre stratégie de déplétion, la majorité des cellules progénitrices CD34⁺ réinjectées sont donc fonctionnelles et vivantes : $6,4 \cdot 10^6$ CD34⁺ IP⁻/kg pour $6,7 \cdot 10^6$ CD34⁺ totales/kg, soit 96% de viabilité (Figure 26).

Cela nous amène à considérer aussi la viabilité de l'ensemble des populations lymphocytaires réinjectées à l'issue de notre stratégie de déplétion. Sur l'ensemble des CSP manipulées, à l'issue de notre stratégie de tri, la viabilité cellulaire évaluée avec l'iodure de propidium était toujours supérieure à 90% dans les différentes fractions destinées à être fusionnées dans l'idée d'une réinjection. À titre d'exemple, voici les données de viabilité lymphocytaire sur la CSP9 qui a permis d'arrêter notre

stratégie de tri définitive pour dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺. Dans la CSP initiale avant tout tri, on constate une viabilité lymphocytaire de 94,7% (5,3% de lymphocytes IP⁺) (Figure 28). À l'issue de la stratégie de tri, on retrouve 8,5% de lymphocytes IP⁺ dans la fraction positive du tri simultané CD8-CD19 pour un total de 21,6.10⁶ lymphocytes/mL et 1,5% de lymphocytes IP⁺ dans la fraction négative du tri CCR7 pour un total de 4,9.10⁶ lymphocytes/mL (Figure 28). Par conséquent, on en déduit que 7,2% des lymphocytes sont IP⁺ dans l'échantillon après le protocole de tri, soit une viabilité proche de 93% des lymphocytes réinjectés (donc supérieure à 90%). Cette proportion de 7,2% est proche de celle retrouvée avant toute manipulation (5,3%), on peut donc en déduire que notre protocole de tri n'altère pas la viabilité des cellules. La différence entre les proportions de lymphocytes IP⁺ dans les fractions positive du premier tri et négative du second tri s'explique par le fait que les cellules mortes ont tendance à être plus retenues par la colonne magnétique même si elles ne sont pas marquées et donc à se retrouver dans la fraction positive.

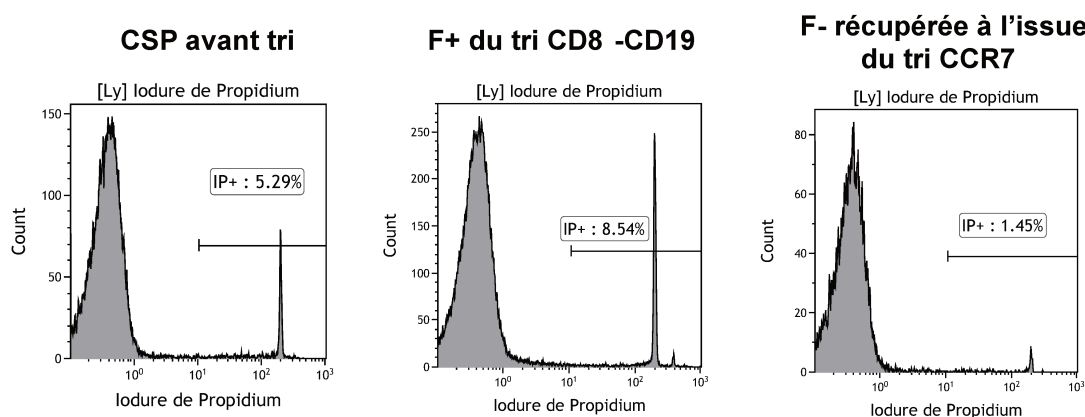


Figure 28 : Étude de la viabilité lymphocytaire par cytométrie en flux sur échantillon de CSP avant tri et sur chacune des fractions destinées à être réinjectées après tri simultané CD8-CD19 suivi du tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri. Les cellules mortes sont IP⁺. (F+ : fraction positive, F- : fraction négative)

On peut donc en conclure que les cellules seront réinjectées vivantes à l'issue de notre stratégie de déplétion en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺.

3.4. Résumé

L'ensemble de ce travail a donc permis de mettre au point *in vitro* sur des petits échantillons de CSP une stratégie automatisée de déplétion en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de greffons de CSP. Il s'agit donc d'un tri simultané CD8-CD19 à l'issue duquel la fraction positive est mise de côté en vue d'être réinjectée suivi d'un tri CCR7 s'appliquant sur la fraction négative du tri simultané. La condition pour le tri simultané CD8-CD19 est de travailler aux concentrations en billes conformes aux

recommandations fournisseur (20 μ L billes CD8/10⁷ CMN et 20 μ L billes CD19/10⁷ CMN) avec le programme de tri plus sensible « Possel-s ». Pour le tri CCR7, il faut aussi utiliser les concentrations en réactifs conformes aux recommandations fournisseur (10 μ L d'anti-CCR7 biotinylé/10⁷ CMN, 20 μ L de billes anti-biotine/10⁷ CMN) et nous avons défini qu'il fallait employer le programme de tri « Possel » sur l'AutoMACS Pro.

IV- DISCUSSION

Au cours de ces dernières années, la greffe haploidentique s'est beaucoup développée notamment avec les avancées de l'équipe de John Hopkins à Baltimore et l'introduction de cyclophosphamide (Endoxan®) dans l'immunosuppression post-greffe (28,29). Néanmoins, des progrès restent encore aujourd'hui à faire pour maîtriser totalement l'alloréactivité majeure dans ce contexte, la réaction de GVH aiguë qui en découle et la toxicité du cyclophosphamide. De nombreuses équipes ont travaillé sur cette question car la greffe familiale haploidentique représente une alternative intéressante pour près de la moitié des candidats à la greffe, ne disposant pas de donneur HLA-identique (20). Ainsi des essais de déplétion en lymphocytes CD3⁺ et CD19⁺ (69) ou en cellules T naïves CD45RA⁺ (77) ont été réalisés. Cependant ces derniers n'ont pas atteint les objectifs espérés en matière de réduction d'incidence de la GVH aiguë ou ne présentent pas encore un recul suffisant pour conclure et juger de l'efficacité. De plus, ces stratégies déplètent des cellules mémoires indispensables pour protéger le patient du risque infectieux en post-greffe. C'est dans ce contexte que se place l'objectif original de notre travail : dépléter sélectivement les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ naïfs et centraux mémoires alloréactifs des greffons haploidentiques de CSP tout en préservant l'ensemble des autres populations cellulaires et notamment les lymphocytes T CD4⁺ mémoires effecteurs et les lymphocytes T CD8⁺, indispensables à l'effet GVL, à la reconstitution immunitaire rapide (82,83) et au maintien de l'immunité anti-infectieuse (84).

En effet, notre équipe a constaté qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dans un greffon constituait un facteur de risque de survenue, précocité et sévérité de la GVH aiguë (78) et que leur déplétion partielle et sélective *in vitro* n'altérait pas la qualité de la réponse anti-infectieuse virale acquise (84). Ce travail en lui-même a consisté à établir, *in vitro* sur échantillons de CSP, la stratégie de tri à utiliser pour dépléter sélectivement les greffons en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ (déplétion d'au moins 80%) sans impacter les autres populations cellulaires en vue d'une transposition ultérieure en clinique (objectif de conservation à hauteur de 70%).

Initialement la stratégie que nous avons envisagée pour dépléter les greffons haploidentiques de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ consistait en une double

sélection positive. L'idée était de sélectionner les lymphocytes T $CD4^+$ dans un premier temps puis, dans un deuxième temps, sélectionner la population $CCR7^+$ au sein de ces lymphocytes T $CD4^+$. Après avoir évalué le tri $CD4$ qui se révélait être tout à fait efficace, nous avons été confrontés à un obstacle majeur : le non-détachement des billes magnétiques couplées aux anticorps anti- $CD4$ de la surface des lymphocytes T $CD4^+$ (Figure 29). Cette difficulté n'avait pas été suspectée au préalable. Initialement, notre seule problématique était de ne pas déclencher l'activation *in vitro* des cellules avant leur réinjection au patient et de procéder au deuxième tri dans les meilleurs délais, avant l'administration programmée de cyclophosphamide à J3. Dans cette situation, il était impossible de programmer un second tri $CCR7$ puisque toutes les cellules $CD4^+$ étant recouvertes de billes, la colonne de tri est dans l'incapacité de distinguer la population $CD4^+ CCR7^+$ de la population $CD4^+ CCR7^-$. Nous avons essayé d'agir sur différents paramètres pour favoriser le détachement des billes : le délai de culture, la concentration des billes couplées aux anticorps anti- $CD4$ utilisée, des étapes de centrifugation, mais aucun de ces facteurs ne s'est révélé suffisamment efficace pour permettre la réalisation d'un second tri $CCR7$.

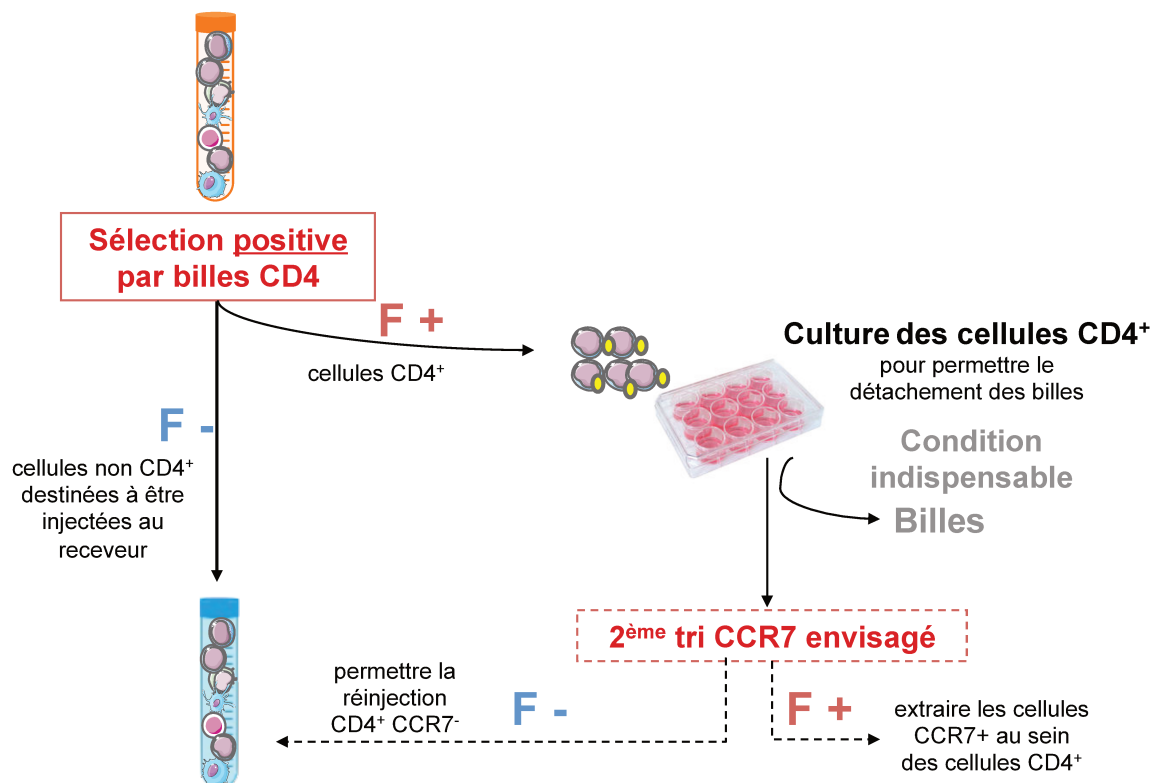


Figure 29 : Stratégie de tri initiale : double sélection positive $CD4^+ CCR7^+$ testée sur échantillons de CSP et impasse due au non-détachement des billes à la surface des lymphocytes T $CD4^+$.

Une solution alternative existe pour détacher les billes : elle repose sur l'utilisation du kit Multisort (Miltenyi Biotec, Allemagne) dans lequel une enzyme vient cliver les billes magnétiques à la surface des lymphocytes T CD4⁺. Cependant tous nos choix dans l'établissement de la stratégie de tri ont été guidés par une application future en clinique, chez l'Homme. Or ce kit Multisort n'est utilisable qu'en recherche et ne peut être utilisé chez l'Homme. Cette idée pour détacher les billes était donc à proscrire dans la mise au point de la stratégie de tri. Nous avons alors envisagé un tri simultané CD4 CCR7 en réglant différents paramètres pour favoriser leur attraction sélective. Malgré nos efforts, cette stratégie triait également une part non négligeable des lymphocytes T CD8⁺ et B. Elle a donc été abandonnée car elle faisait perdre l'originalité de notre projet si les cellules impliquées dans le maintien de l'immunité anti-infectieuse ne pouvaient être préservées.

En reprenant la littérature sur les essais de déplétion, nous nous sommes aperçus que la double sélection positive comportait bien un obstacle majeur car à ce stade, aucune équipe n'avait réussi à la mettre en place en pratique. Toutes ont recours à des stratégies alternatives. Ainsi, Federmann *et al.*, dans leur essai de déplétion des lymphocytes CD3⁺ et CD19⁺ ne réalisent qu'un seul tri (69). Et lorsque deux tris sont réalisés, elles n'ont pas recours à une double sélection positive. De même, quand Bleakley *et al.* ont développé la déplétion en lymphocytes T CD45RA⁺, ils ont opté pour une première sélection positive des cellules progénitrices CD34⁺ (qui expriment CD45RA) en vue de les préserver puis, sur la fraction négative issue du premier tri, ils réalisent une déplétion des cellules CD45RA⁺ (*Figure 30 (a)*). Cette stratégie est peu spécifique car elle ne permet pas de préserver la majorité des lymphocytes B et NK qui expriment également le marqueur CD45RA (75). Shook *et al.*, dans cette même impossibilité de réaliser une double sélection positive, ont contourné différemment ce problème. Deux prélèvements de CSP sont réalisés chez les donneurs par cytophérèse sur deux jours consécutifs : le premier subit une déplétion CD3 pour éliminer tous les lymphocytes T et la deuxième poche subit un tri CD45RA pour éliminer toutes les cellules T naïves (mais conduisant aussi à l'élimination d'une partie des B, NK et cellules progénitrices CD34⁺, qui sera compensée par la première poche dans laquelle ces cellules n'ont pas été impactées par le tri CD3). À l'issue de ces deux tris, les deux poches sont *poolées* pour être réinjectées chez le receveur (77). Ainsi Shook *et al.* emploient une voie détournée pour échapper au problème de la double sélection positive (*Figure 30 (b)*).

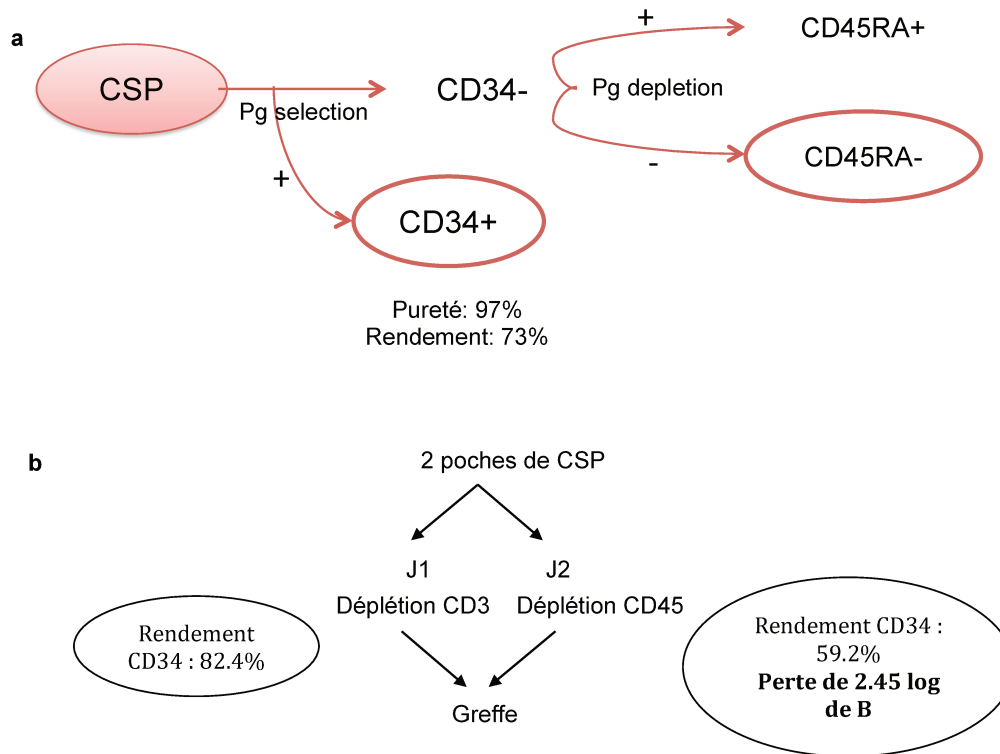


Figure 30 : Stratégies de tri utilisées dans d'autres essais cliniques pour contourner le problème de la double sélection positive. (a) Sélection positive des cellules progénitrices $CD34^+$ puis déplétion des cellules $CD45RA^+$ sur la fraction négative du premier tri (75). (b) Séparation en 2 poches de CSP pour réaliser d'une part un tri positif CD3 et d'autre part un tri positif CD45RA (77). (Pg : programme)

Devant cette impasse, nous avons conçu une stratégie basée sur la préservation d'emblée des cellules $CCR7^+$ d'intérêt. Ainsi, la première stratégie alternative conçue repose sur le tri des lymphocytes T $CD8^+$ dans un premier temps, permettant de préserver immédiatement les lymphocytes T $CD8^+$ dans la fraction positive en vue de les réinjecter au patient, et dans un deuxième temps le tri $CCR7$ sur la fraction négative issue du premier tri (Figure 31). Cette stratégie présente le double avantage de s'affranchir du non-détachement des billes magnétiques à la surface des cellules mais également de l'étape de culture. En effet, cette dernière était un point délicat de notre premier protocole puisqu'elle conduisait à une réinjection décalée des lymphocytes T $CD4^+ CCR7^-$ chez le receveur. Or une injection de cyclophosphamide à J3 sera incluse dans le protocole clinique. Une réinjection d'une fraction de cellules trop rapprochée de l'injection de cyclophosphamide représentait un risque d'une destruction rapide de ces cellules.

Un tri $CCR7$ sur la fraction négative issue d'un premier tri $CD8$ nous a révélé une nouvelle difficulté : les lymphocytes B étaient en grande partie éliminés dans le tri $CCR7$ du fait de leur expression de ce marqueur et ne pourraient par conséquent pas être réinjectés au receveur dans cette stratégie (Figure 31).

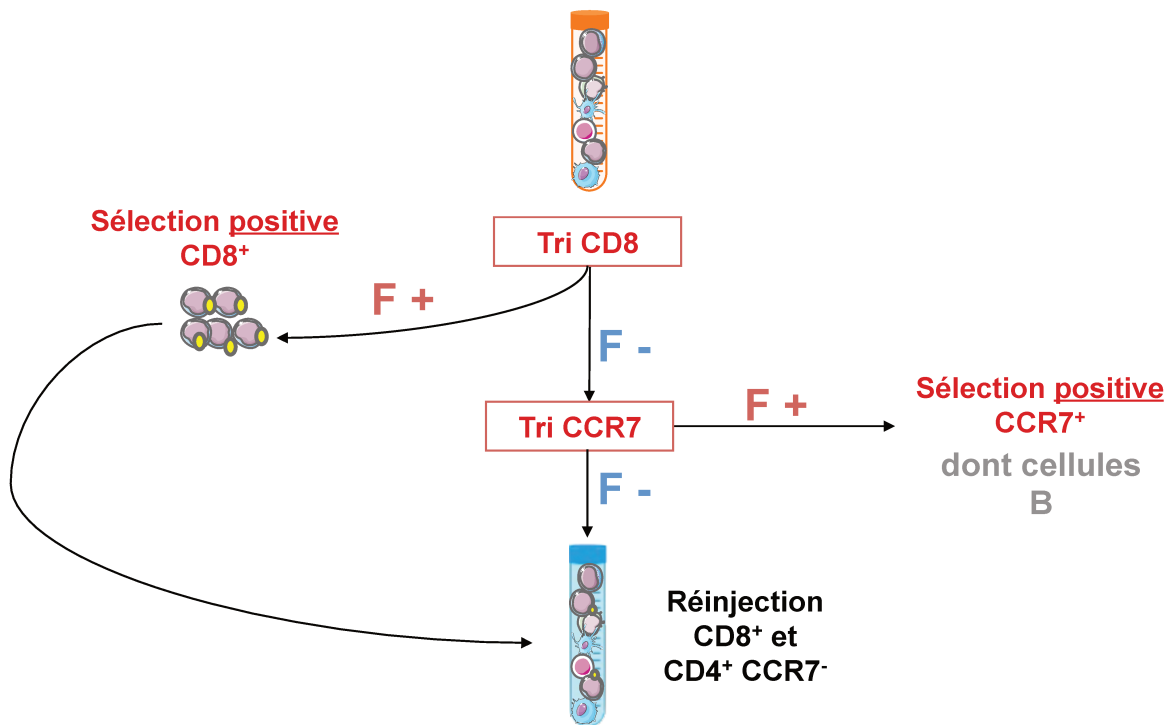


Figure 31 : Stratégie de tri alternative faisant intervenir un tri CD8 suivi d'un tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri. Le problème majeur de cette stratégie repose sur le tri des lymphocytes B en grande partie dans le tri CCR7.

La question s'est alors posée de l'impact d'une perte d'une grande partie des cellules B du donneur. Dans la littérature, l'impact et le rôle des lymphocytes B dans la GVH aiguë sont contradictoires. Ainsi, dans un modèle murin, il semble que les lymphocytes B du donneur soient associés à un risque de GVH aiguë diminué de par leur sécrétion d'IL-10 (95), alors que Iori *et al.* ont montré une association forte entre un nombre élevé de lymphocytes B CD20⁺ dans un greffon de CSP et un risque accru de GVH aiguë et de mortalité liée à la greffe (96). Plus précisément il semble que ce sont plutôt les progéniteurs B, les polymphocytes B en grande quantité dans un greffon de moelle osseuse qui sont associés à un risque diminué de GVH aiguë. En effet, la différenciation B en lymphocytes B matures dans l'environnement médullaire du receveur contribuerait à l'émergence de cellules B tolérantes qui exerceraient leurs fonctions régulatrices sur les lymphocytes T. À l'inverse, les greffons de CSP qui contiennent majoritairement des B matures se comportant comme des cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T expliquent ainsi leur rôle dans l'incidence de la GVH aiguë (97). De même Storek *et al.* ont montré qu'un faible nombre de précurseurs B chez le receveur après allogreffe était associé à un risque plus élevé de GVH aiguë et chronique (98). Enfin le rôle des lymphocytes B comme cellules régulatrices dans l'autoimmunité a aussi été décrit (99). Shimabukuro *et al.*, dans une revue de la littérature reviennent en détail sur le rôle des lymphocytes B

dans la greffe de CSH et notamment sur leur rôle ambivalent dans la GVH aiguë (Figure 32) (100). Ils montrent également que les receveurs de CSH sont à risque élevé d'infections en particulier à germes encapsulés en raison des faibles niveaux en immunoglobulines et de la lente reconstitution du compartiment B. Ainsi ne pas préserver les lymphocytes B augmenterait le risque d'infections. Dans l'article de Federmann *et al.*, relatant l'essai clinique de déplétion des greffons haploidentiques en lymphocytes T et B, on constate la part importante de décès liés à une infection (26% des patients, 16/61) alors que parallèlement la diminution de la GVH n'a pas atteint l'objectif espéré (69).

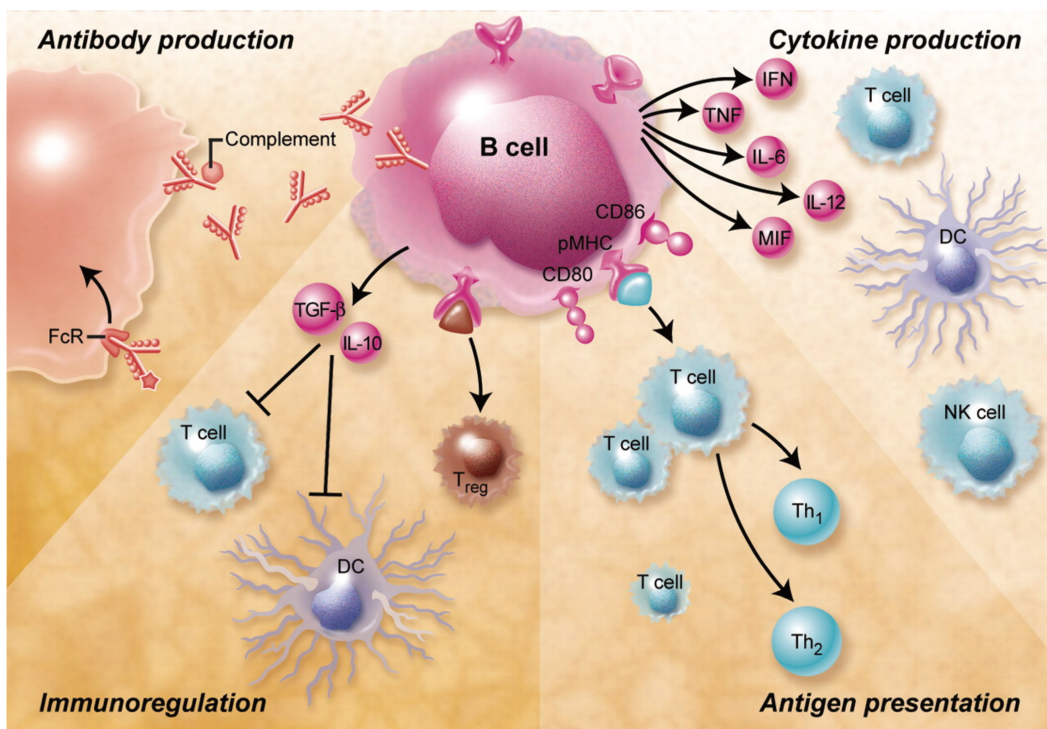


Figure 32 : Rôle ambivalent des lymphocytes B dans la GVH. Par la production d'anticorps les lymphocytes B peuvent activer le complément et la phagocytose. De plus, ils sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines proinflammatoires et ainsi activer un grand nombre de cellules impliquées dans la GVH ou dans sa régulation. Les lymphocytes B se comportent également comme des CPAg pour les lymphocytes T, acteurs principaux de la GVH aiguë. D'autre part les lymphocytes B peuvent aussi se comporter comme cellules immunorégulatrices induisant ainsi une tolérance des lymphocytes T (100).

Ces données, plutôt contributives à une stratégie de réinjection des cellules B du donneur, sont néanmoins à nuancer avec le risque potentiel de favoriser la survenue de lymphome induit chez le receveur. En effet, les lymphocytes B jouent un rôle pathogène non négligeable dans les maladies lymphoprolifératives post-transplantation (PTLD) liées notamment à des infections à EBV (101). Le risque de PTLD est d'autant plus élevé que le greffon est déplété en lymphocytes T (102). Cette pathologie est notamment associée à un taux de mortalité très important et dépléter les lymphocytes B des greffons en écarterait le risque. Cependant cette

pathologie reste rare avec un risque de PTLD apparemment plus élevé chez l'enfant que chez l'adulte (101,102). En effet, la proportion de sujets séronégatifs pour l'EBV est plus importante chez les enfants, la population adulte étant en très grande majorité séropositive pour l'EBV.

Au vu de l'ensemble de ces données, nous avons décidé de préserver les lymphocytes B pour pouvoir les réinjecter au receveur. Ainsi, notre stratégie initiale de dépleter sélectivement les greffons haploidentiques en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ reste respectée. Cela nous permettra d'attribuer la diminution de la fréquence et de la sévérité de la GVH aiguë à la déplétion de cette unique population CD4⁺ CCR7⁺. Il conviendra de ce fait d'être particulièrement vigilant au risque de maladie lymphoproliférative post-transplantation chez les très rares receveurs séronégatifs pour l'EBV que nous pourrions avoir dans l'essai clinique ou à l'avenir.

La stratégie finale adoptée comporte ainsi un premier tri simultané CD8-CD19, permettant de préserver immédiatement les lymphocytes T CD8⁺ et B en vue de les réinjecter ultérieurement au receveur. Dans la suite immédiate de ce premier tri, un tri CCR7 sur la fraction négative est mis en œuvre. À l'issue de ces deux tris, les fractions positive du premier tri et négative du second tri sont réunies en vue de reconstituer notre greffon (*Figure 33*). Cette stratégie, comme vu dans les résultats, préserve l'ensemble des populations cellulaires du greffon à hauteur d'au moins 70% à l'exception bien évidemment des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ dont l'élimination dépasse 80%.

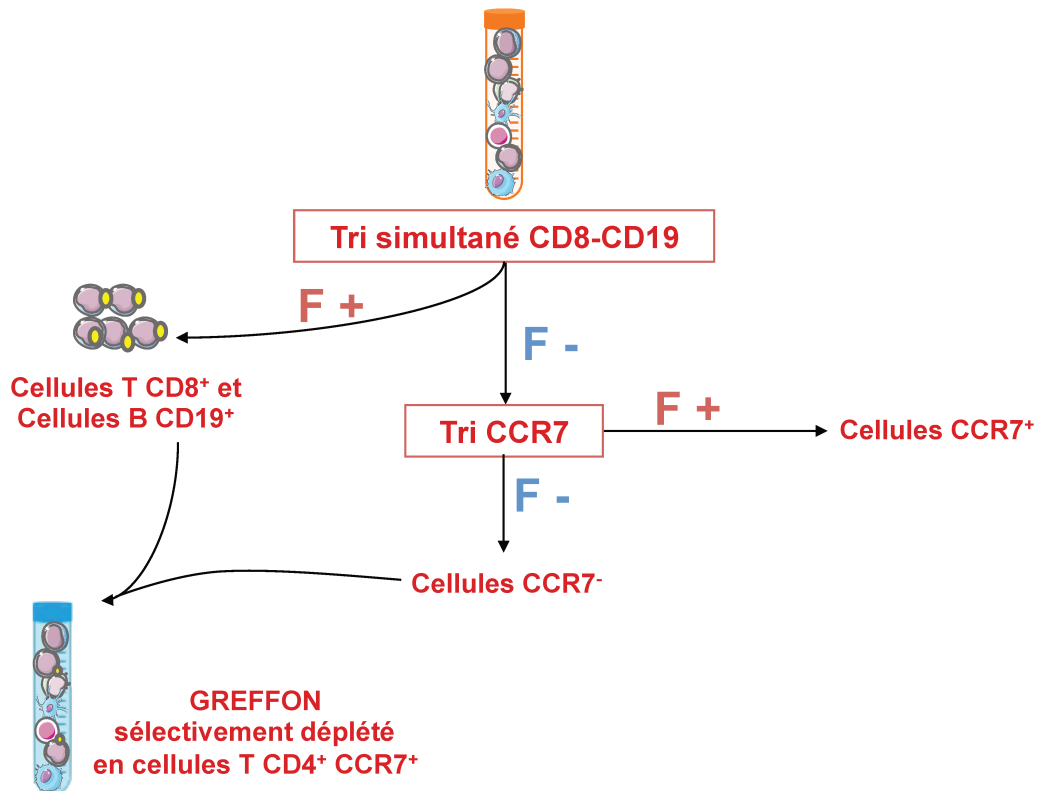


Figure 33 : Stratégie de tri finale mise au point sur échantillons de CSP faisant intervenir un tri simultané CD8-CD19 suivi d'un tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri.

À ce stade, seuls deux échantillons de CSP ont fait l'objet de cette stratégie de tri et il convient de vérifier la reproductibilité de notre stratégie de tri sur un plus grand nombre d'échantillons. Ainsi sur les futurs échantillons de CSP, on évaluera la composition cellulaire en cellules progénitrices $CD34^+$ et immunocompétentes avant et après tri par cytométrie en flux. Pour les cellules progénitrices $CD34^+$, l'exigence est une préservation d'au moins 70% par rapport au greffon initial et/ou au moins $3.10^6 CD34^+/kg$ dans la poche par extrapolation. Nous savons que pour nos essais sur échantillons de CSP avec l'AutoMACS Pro, nous travaillons dans des conditions stringentes. En effet, le CliniMACS, validé pour le tri à usage clinique, est un circuit fermé contrairement à l'AutoMACS Pro. De ce fait, nous aurons moins de pertes cellulaires lors du passage sur poches. De plus lors de la mise au point sur échantillons de CSP, nous avons parfois été amenés à travailler avec des échantillons à J2 post-prélèvement puisque ces greffons provenaient parfois d'Allemagne ou des États-Unis. Dans le cadre de l'essai clinique, nous serons dans des conditions de délai maîtrisé : en effet, la greffe haploidentique étant une greffe familiale, la prise en charge du greffon pour le tri sera programmable dès la cytophérèse effectuée. Enfin, en travaillant sur CSP, nous pourrons ajuster le

prélèvement des donneurs pour être au dessus du seuil de 3.10^6 CD34⁺/kg dans la poche après tri.

Notre perspective immédiate aujourd'hui, outre d'asseoir la reproductibilité de nos tris, est de s'assurer de la bonne fonctionnalité de nos cellules au sein de notre greffon reconstitué à l'issue des deux tris. Pour ce faire, une fraction de l'échantillon de CSP avant tri et une autre récupérée après tri seront mises en culture pour comparer la fonctionnalité des progéniteurs, l'immunité anti-infectieuse et la réponse alloréactive (Figure 34).

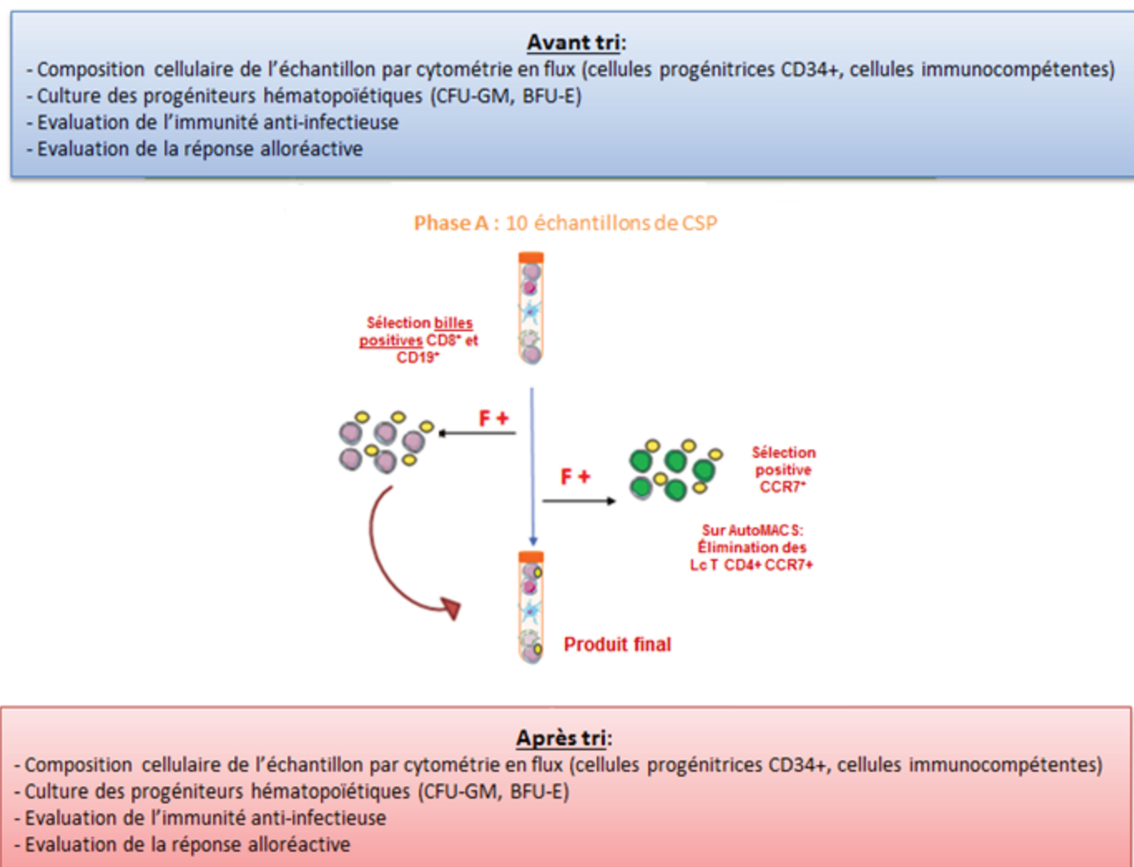


Figure 34 : Évaluation de la stratégie de tri choisie pour dépléter les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ sur échantillons de CSP.

L'étude de l'immunité anti-infectieuse se fera par culture des CMN avant et après tri en présence de peptides viraux (HTLV1, adénovirus, CMV, EBV) (84). À l'issue de la culture, on évaluera la capacité des cellules à produire de l'IFN γ et donc à répondre à un agent infectieux (Figure 35). Nous espérons un maintien de la production d'IFN γ avant et après tri et donc un maintien de l'immunité anti-infectieuse.

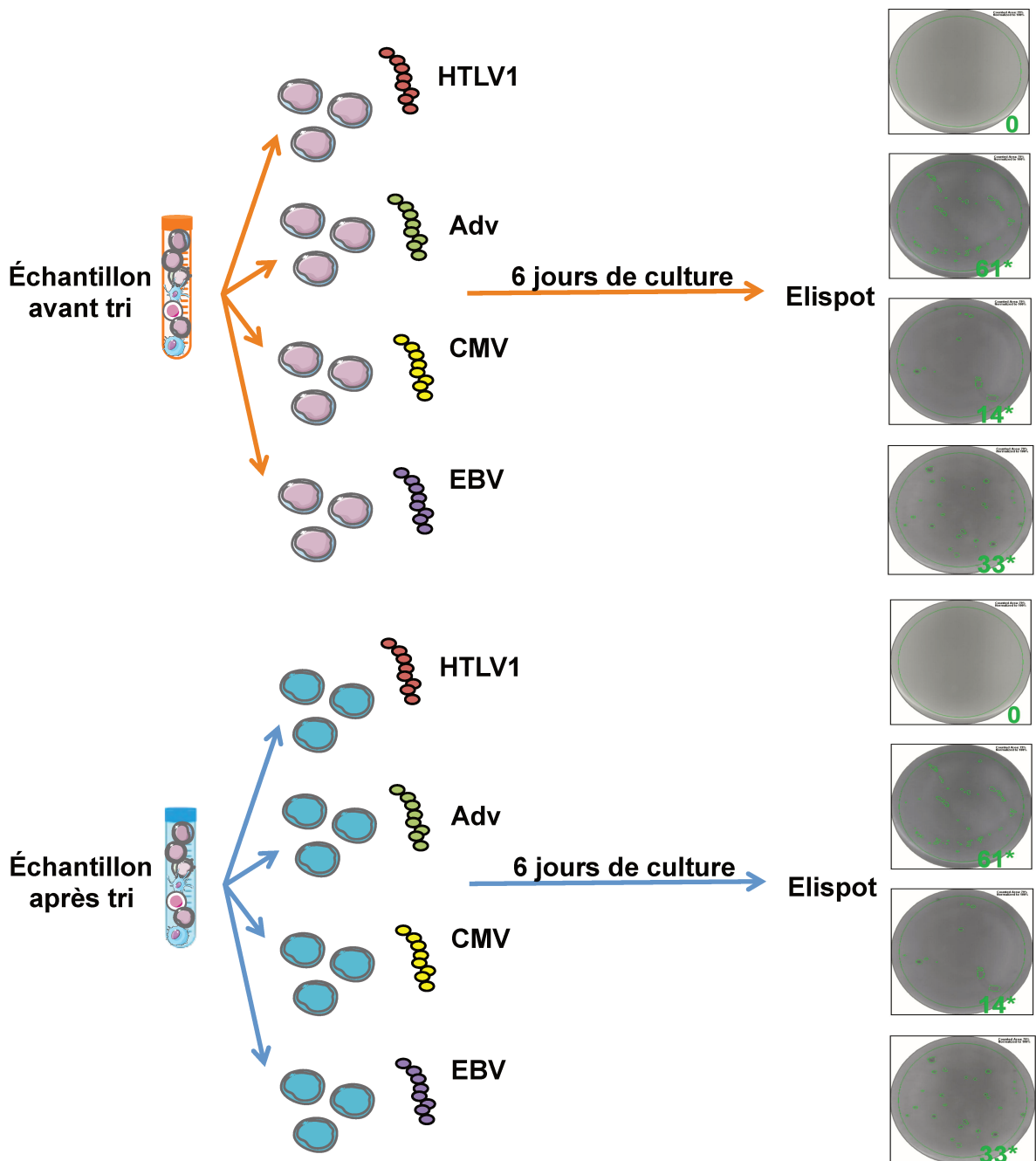


Figure 35 : Stratégie d'évaluation de la réponse anti-infectieuse avant et après procédure de déplétion des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺. On s'attend à un maintien de la réponse anti-infectieuse aux différents peptides viraux après tri. (HTLV1 : Virus T-Lymphotrope Humain de type 1, Adv : Adénovirus, CMV : Cytomégalovirus, EBV : Epstein Barr Virus)

La réponse alloréactive avant et après tri sera évaluée par culture des CMN issus des échantillons non triés et triés en présence de cellules dendritiques allogéniques. À l'issue de la culture, on s'intéressera à la capacité alloréactive des cellules de la même façon que précédemment, c'est-à-dire par évaluation de la capacité des cellules à produire de l'IFN γ (Figure 36). Nous nous attendons à une diminution de la production d'IFN γ à partir de l'échantillon trié afin de montrer qu'on a bien une diminution de la réponse alloréactive par déplétion des lymphocytes T CD4⁺

CCR7⁺ et qu'on peut donc bien espérer une diminution de la GVH aiguë chez les receveurs.

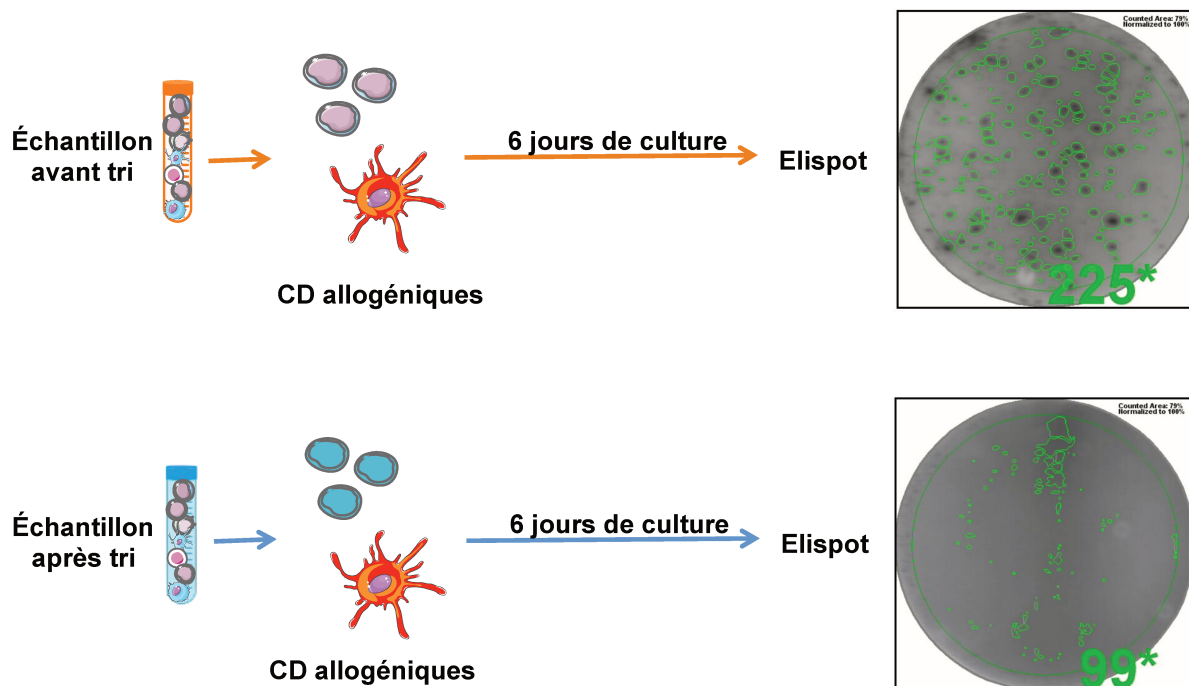


Figure 36 : Stratégie d'évaluation de la réponse alloréactive avant et après procédure de déplétion des lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺. On s'attend à une diminution de l'alloréactivité après tri. (CD : Cellules Dendritiques)

Une fois tous ces résultats obtenus et l'évaluation de la stratégie de déplétion validée sur échantillons, nous transposerons la stratégie de tri sur poches décongelées destinées à la destruction sur le CliniMACS (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les mêmes critères d'évaluation et de validation seront requis (Figure 34) et la stérilité de la poche triée sera en plus exigée avant le passage à un essai clinique de phase I/II. Le passage à l'essai clinique nécessitera des démarches administratives pour la qualification d'un lot de réactifs du tri CCR7 au grade clinique.

V- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Par ce travail, nous avons réussi à mettre au point un protocole de tri automatisé pour dépler les échantillons de greffons haploidentiques de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ sur l'AutoMACS Pro. Tous les choix effectués ont été guidés par une application future en clinique. Ainsi, notre stratégie définitive est basée sur un tri simultané CD8-CD19 suivi d'un tri CCR7. Même si l'emploi de 3 tris alourdit le coût de la procédure, cette option était la seule garantissant le respect de nos objectifs initiaux.

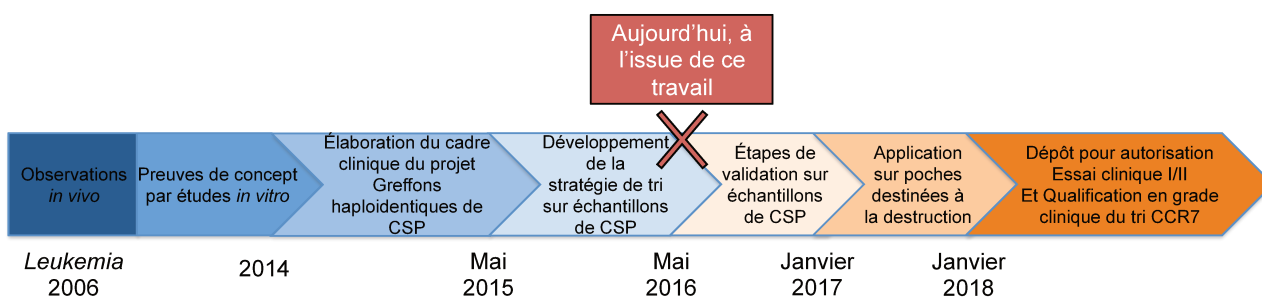


Figure 37 : Chronologie du projet de déplétion des greffons de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺.

Nous démarrons à présent l'étape de validation de cette stratégie de tri en matière de respect des critères de composition cellulaire, avant et après tri, de maintien de la fonctionnalité des progéniteurs hématopoïétiques, maintien de l'immunité anti-infectieuse et diminution de l'alloréactivité (Figure 37). Après validation de l'ensemble de ces points sur échantillons de CSP, la procédure sera testée sur poches de CSP destinées à la destruction. Lors du passage sur poches, la stratégie de tri sera transposée sur le CliniMACS, équivalent clinique de l'AutoMACS Pro. L'utilisation préalable du CliniMACS dans divers essais cliniques de déplétion à travers le monde nous conforte dans la faisabilité de la réalisation de notre essai et de l'application de notre stratégie. Bien qu'historiquement ce sont les greffons de moelle osseuse qui étaient préférés dans la greffe haploidentique, cet essai vise à utiliser des greffons de CSP, plus riches, se prêtant mieux à des stratégies de déplétion et offrant la possibilité d'une poche de secours lors de l'essai clinique. Le potentiel de ce projet est donc important puisqu'il vise des greffons de CSP et la greffe haploidentique, aux options en pleine expansion.

L'objectif à une échéance de 2-3 ans est la mise en œuvre d'un essai clinique de phase I/II en collaboration avec le service des Maladies du Sang de l'Hôpital Huriez du CHRU de Lille et l'EFS Nord de France.

Par cette approche, nous attendons une diminution de la GVH aiguë chez les receveurs et à terme une diminution du recours au cyclophosphamide dans l'immunosuppression post-greffe, limitant de par sa toxicité les indications de la greffe haploidentique chez les patients présentant des comorbidités. Ainsi, par la limitation de l'emploi du cyclophosphamide, nous espérons étendre l'accès à la greffe haploidentique à un plus grand nombre de patients ne disposant pas aujourd'hui de donneurs HLA-compatibles 10/10.

VI- BIBLIOGRAPHIE

1. Boyiadzis M, Pavletic S. Haematopoietic stem cell transplantation: indications, clinical developments and future directions. *Expert Opin Pharmacother*. 2004 Jan 1;5(1):97–108.
2. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Aug;50(8):1037–56.
3. Mahmoud HK, Elhaddad AM, Fahmy OA, Samra MA, Abdelfattah RM, El-Nahass YH, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant hematological disorders. *J Adv Res*. 2015 May;6(3):449–58.
4. Surapolchai P, Sirachainan N, So C-C, Hongeng S, Pakakasama S, Anurathapan U, et al. Curative Stem Cell Transplantation for Severe Hb H Disease Manifesting From Early Infancy: Phenotypic and Genotypic Analyses. *Hemoglobin*. 2016;40(1):70–3.
5. Booth C, Silva J, Veys P. Stem cell transplantation for the treatment of immunodeficiency in children: current status and hopes for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016 Feb 16;0(0):1–11.
6. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2016 Feb 22 [cited 2016 Mar 26]; Available from: <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/bmt/journal/vaop/ncurrent/full/bmt201620a.html>
7. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol*. 1999 Oct;36(4 Suppl 7):95–103.
8. Bacigalupo A, Sormani MP, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Bregante S, et al. Reducing transplant-related mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004 Jan 1;89(10):1238–47.
9. Dausset J. The HLA adventure. *Transplant Proc*. 1999 Mar;31(1-2):22–4.
10. Kuby J, Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. Chapitre 8: Complexe majeur d'histocompatibilité et présentation de l'antigène. In: *Immunologie [le cours de Janis Kuby]*. 7ème ed. Paris: Dunod; 2014. p. 261–98.
11. European Federation for Immunogenetics. STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING Version 6.3 [Internet]. 2015. Available from: http://www.efiweb.eu/fileadmin/user_upload/Website_documenten/EFI_Committees/Standards_Committee/Standardv6.3.pdf
12. Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete C, et al. Histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors: report from The World Marrow Donor Association. Quality Assurance and Donor Registries Working Groups of the World Marrow Donor Association. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Jul;24(2):119–21.
13. Yakoub-Agha I. Transplantations from HLA-identical siblings versus 10/10 HLA-matched unrelated donors. *Semin Hematol*. 2016 Apr;53(2):74–6.
14. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4576–83.

15. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009 Aug 13;114(7):1437–44.
16. Thus KA, Ruizendaal MTA, de Hoop TA, Borst E, van Deutekom HWM, Te Boome L, et al. Refinement of the definition of permissible HLA-DPB1 mismatches with predicted indirectly recognizable HLA-DPB1 epitopes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2014 Nov;20(11):1705–10.
17. Gagne K, Loiseau P, Dubois V, Dufossé F, Perrier P, Dormoy A, et al. Is there any impact of HLA-DPB1 disparity in 10/10 HLA-matched unrelated hematopoietic SCT? Results of a French multicentric retrospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Feb;50(2):232–6.
18. Ciurea SO, Bayraktar UD. “No donor”? Consider a haploidentical transplant. *Blood Rev*. 2015 Mar;29(2):63–70.
19. 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.
20. Fuchs EJ. HLA-haploidentical blood or marrow transplantation with high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Jun;50 Suppl 2:S31–6.
21. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):334–43.
22. Powles RL, Morgenstern GR, Kay HE, McElwain TJ, Clink HM, Dady PJ, et al. Mismatched family donors for bone-marrow transplantation as treatment for acute leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 1983 Mar 19;1(8325):612–5.
23. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, et al. Marrow Transplantation from Related Donors Other Than HLA-Identical Siblings. *N Engl J Med*. 1985 Sep 26;313(13):765–71.
24. Kernan NA, Bordignon C, Keever CA, Cunningham I, Castro-Malaspina H, Collins NH, et al. Graft failures after T cell depleted marrow transplants for leukemia: clinical and in vitro characteristics. *Transplant Proc*. 1987 Dec;19(6 Suppl 7):29–32.
25. Huang X-J, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P, Chen H, Han W, et al. Treatment of Acute Leukemia with Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Blood and Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Feb;15(2):257–65.
26. Wang Y, Liu D-H, Liu K-Y, Xu L-P, Zhang X-H, Han W, et al. Long-term follow-up of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T cell depletion for the treatment of leukemia. *Cancer*. 2013 Mar 1;119(5):978–85.
27. Lee K-H, Lee J-H, Lee J-H, Kim D-Y, Seol M, Lee Y-S, et al. Reduced-intensity conditioning therapy with busulfan, fludarabine, and antithymocyte globulin for HLA-haploidentical hematopoietic cell transplantation in acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2011 Sep 1;118(9):2609–17.
28. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2008 Jun;14(6):641–50.

29. Luznik L, Fuchs EJ. High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res.* 2010 Jul;47(1-3):65–77.
30. Blaise D, Nguyen S, Bay J-O, Chevallier P, Contentin N, Dhédin N, et al. Greffes de cellules souches hématopoïétiques à partir d'un donneur haplo-identique : recommandations de la SFGM-TC (première partie). *Pathol Biol.* 2014 Aug;62(4):180–4.
31. Ciurea SO, Mulanovich V, Saliba RM, Bayraktar UD, Jiang Y, Bassett R, et al. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2012 Dec;18(12):1835–44.
32. Nguyen S, Blaise D, Bay J-O, Chevallier P, Contentin N, Dhédin N, et al. [Allogeneic stem cell transplantation from an HLA-haploidentical related donor: SFGM-TC recommendations (part 2)]. *Pathol Biol (Paris).* 2014 Aug;62(4):185–9.
33. Kasamon YL, Bolaños-Meade J, Prince GT, Tsai H-L, McCurdy SR, Kanakry JA, et al. Outcomes of Nonmyeloablative HLA-Haploidentical Blood or Marrow Transplantation With High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide in Older Adults. *J Clin Oncol.* 2015 Oct 1;33(28):3152–61.
34. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, Manion K, Brown S, Holland HK, et al. T-Cell–Replete HLA-Haploidentical Hematopoietic Transplantation for Hematologic Malignancies Using Post-Transplantation Cyclophosphamide Results in Outcomes Equivalent to Those of Contemporaneous HLA-Matched Related and Unrelated Donor Transplantation. *J Clin Oncol.* 2013 Apr 1;31(10):1310–6.
35. Fabricius WA, Ramanathan M. Review on Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Hematologic Malignancies. *Adv Hematol.* 2016;2016:5726132.
36. McCurdy SR, Fuchs EJ. Comparable Outcomes for Hematologic Malignancies after HLA-Haploidentical Transplantation with Posttransplantation Cyclophosphamide and HLA-Matched Transplantation. *Adv Hematol.* 2015;2015:431923.
37. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, Zhang X, Brown S, Holland HK, et al. Total Body Irradiation-Based Myeloablative Haploidentical Stem Cell Transplantation Is a Safe and Effective Alternative to Unrelated Donor Transplantation in Patients Without Matched Sibling Donors. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2015 Jul;21(7):1299–307.
38. El-Cheikh J, Crocchiolo R, Furst S, Bramanti S, Sarina B, Granata A, et al. Unrelated cord blood compared with haploidentical grafts in patients with hematological malignancies. *Cancer.* 2015 Jun 1;121(11):1809–16.
39. Raiola AM, Dominietto A, di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatici A, et al. Unmanipulated Haploidentical Transplants Compared with Other Alternative Donors and Matched Sibling Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Oct;20(10):1573–9.
40. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, Storer BE, Luznik L, Symons HJ, et al. Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2008 Nov;14(11):1279–87.
41. McCurdy SR, Kanakry JA, Showel MM, Tsai H-L, Bolaños-Meade J, Rosner GL, et al. Risk-stratified outcomes of nonmyeloablative, HLA-haploidentical BMT with high-dose posttransplantation cyclophosphamide. *Blood.* 2015 Jan 1;blood – 2015–01 – 623991.

42. Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, Di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, et al. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1):117–22.
43. Solomon SR, Sizemore CA, Sanacore M, Zhang X, Brown S, Holland HK, et al. Haploidentical transplantation using T cell replete peripheral blood stem cells and myeloablative conditioning in patients with high-risk hematologic malignancies who lack conventional donors is well tolerated and produces excellent relapse-free survival: results of a prospective phase II trial. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2012 Dec;18(12):1859–66.
44. Ciurea SO, de Lima M, Cano P, Korbling M, Giralt S, Shpall EJ, et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation*. 2009 Oct 27;88(8):1019–24.
45. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966 1967;62:21–78.
46. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139–70.
47. 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.
48. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet*. 2009 May 8;373(9674):1550–61.
49. 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.
50. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1996 Feb 1;334(5):281–5.
51. 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.
52. 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.
53. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JLM. Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):3204–13.
54. Jenq RR, van den Brink MRM. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010 Mar;10(3):213–21.
55. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*. 2003;54:29–52.
56. Arai S, Lee LA, Vogelsang GB. A systematic approach to hepatic complications in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002 Apr;11(2):215–29.

57. 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.
58. 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.
59. Carlens S, Ringdén O, Remberger M, Lönnqvist B, Hägglund H, Klaesson S, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Oct;22(8):755–61.
60. Koc S, Leisenring W, Flowers MED, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, et al. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):48–51.
61. Radojic V, Pletneva MA, Couriel DR. The role of extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Transfus Apher Sci*. 2015 Apr;52(2):157–61.
62. Weitz M, Strahm B, Meerpohl JJ, Schmidt M, Bassler D. Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;12:CD009898.
63. Remberger M, Törlén J, Ringdén O, Engström M, Watz E, Uhlin M, et al. Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 May;21(5):889–93.
64. Storek J, Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3380–9.
65. Collins NH, Gee AP, Durett AG, Kan F, Zhang M-J, Champlin RE, et al. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Feb;16(2):253–62.
66. 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.
67. 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.
68. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014 Apr;14(4):750–63.
69. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica*. 2012 Oct;97(10):1523–31.
70. Chaleff S, Otto M, Barfield RC, Leimig T, Iyengar R, Martin J, et al. A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2007;9(8):746–54.

71. Pagliara D, Pende D, Rutella S, Falco M, Bauquet A, Contoli B, et al. Removal Of Alpha/Beta+ T Cells and Of CD19+ B Cells From The Graft Translates Into Rapid Engraftment, Absence Of Visceral Graft-Versus-Host Disease and Low Transplant-Related Mortality In Children With Acute Leukemia Given HLA-Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 2013 Nov 15;122(21):157–157.
72. Martelli MF, Ianni MD, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):638–44.
73. Martelli MF, Ianni MD, Ruggeri L, Pierini A, Falzetti F, Carotti A, et al. “Designed” grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood*. 2014 Feb 13;123(7):967–73.
74. Teschner D, Distler E, Wehler D, Frey M, Marandiuc D, Langeveld K, et al. Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Jan;49(1):138–44.
75. Bleakley M, Heimfeld S, Jones LA, Turtle C, Krause D, Riddell SR, et al. Engineering Human Peripheral Blood Stem Cell Grafts that Are Depleted of Naïve T Cells and Retain Functional Pathogen-Specific Memory T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 May;20(5):705–16.
76. Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, Jones LA, Chaney C, Seropian S, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell–depleted stem cell grafts. *J Clin Invest*. 2015 Jul 1;125(7):2677–89.
77. Shook DR, Triplett BM, Eldridge PW, Kang G, Srinivasan A, Leung W. Haploidentical stem cell transplantation augmented by CD45RA negative lymphocytes provides rapid engraftment and excellent tolerability. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Apr 1;62(4):666–73.
78. 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 Jul 6;20(9):1557–65.
79. Chérel M, Choufi B, Trauet J, Cracco P, Dessaint J-P, Yakoub-Agha I, et al. Naïve subset develops the most important alloreactive response among human CD4+T lymphocytes in Human Leukocyte Antigen-identical related setting. *Eur J Haematol*. 2014 Jun 1;92(6):491–6.
80. Coghill JM, Carlson MJ, Panoskaltsis-Mortari A, West ML, Burgents JE, Blazar BR, et al. Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4914–22.
81. Zheng H, Matte-Martone C, Li H, Anderson BE, Venketesan S, Sheng Tan H, et al. Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2476–84.
82. Anderson BE, McNiff J, Yan J, Doyle H, Mamula M, Shlomchik MJ, et al. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2003 Jul 1;112(1):101–8.
83. Chen BJ, Cui X, Sempowski GD, Liu C, Chao NJ. Transfer of allogeneic CD62L– memory T cells without graft-versus-host disease. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1534–41.
84. Choufi B, Trauet J, Thiant S, Labalette M, Yakoub-Agha I. Donor-derived CD4+/CCR7+ T-cell partial selective depletion does not alter acquired anti-infective immunity. *Bone Marrow Transplant*. 2014 May;49(5):611–5.
85. Morrison BE, Park SJ, Mooney JM, Mehrad B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1862–70.

86. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):433–40.
87. Melenhorst JJ, Scheinberg P, Williams A, Ambrozak DR, Keyvanfar K, Smith M, et al. Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naïve and antigen-experienced T cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2011 Jun;17(6):800–9.
88. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr 1;9(2):255–66.
89. Vuckovic S, Kim M, Khalil D, Turtle CJ, Crosbie GV, Williams N, et al. Granulocyte-colony stimulating factor increases CD123hi blood dendritic cells with altered CD62L and CCR7 expression. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2314–7.
90. Lundqvist A, Smith AL, Takahashi Y, Wong S, Bahceci E, Cook L, et al. Differences in the Phenotype, Cytokine Gene Expression Profiles, and In Vivo Alloreactivity of T Cells Mobilized with Plerixafor Compared with G-CSF. *J Immunol*. 2013 Dec 15;191(12):6241–9.
91. Barfield RC, Otto M, Houston J, Holladay M, Geiger T, Martin J, et al. A one-step large-scale method for T- and B-cell depletion of mobilized PBSC for allogeneic transplantation. *Cytotherapy*. 2004;6(1):1–6.
92. Schumm M, Lang P, Bethge W, Faul C, Feuchtinger T, Pfeiffer M, et al. Depletion of T-cell receptor alpha/beta and CD19 positive cells from apheresis products with the CliniMACS device. *Cytotherapy*. 2013 Oct;15(10):1253–8.
93. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3685–91.
94. Farhan S, Peres E, Janakiraman N. Choice of Unmanipulated T Cell Replete Graft for Haploidentical Stem Cell Transplant and Posttransplant Cyclophosphamide in Hematologic Malignancies in Adults: Peripheral Blood or Bone Marrow-Review of Published Literature. *Adv Hematol*. 2016;2016:6950346.
95. Rowe V, Banovic T, MacDonald KP, Kuns R, Don AL, Morris ES, et al. Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2485–92.
96. Iori AP, Torelli GF, De Propriis MS, Milano F, Pupella S, Gozzer M, et al. B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2008 Feb 15;85(3):386–90.
97. Michonneau D, Peffault de Latour R, Porcher R, Robin M, Benbunan M, Rocha V, et al. Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Br J Haematol*. 2009 Apr;145(1):107–14.
98. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2001 Jul 15;98(2):489–91.
99. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):391–7.
100. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Dec 3;114(24):4919–27.

101. Abed N, Casper JT, Camitta BM, Margolis D, Trost B, Orentas R, et al. Evaluation of histogenesis of B-lymphocytes in pediatric EBV-related post-transplant lymphoproliferative disorders. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Feb;33(3):321–7.
102. De Pasquale MD, Mastronuzzi A, De Vito R, Cometa A, Inserra A, Russo C, et al. Unmanipulated donor lymphocytes for EBV-related PTLD after T-cell depleted HLA-haploidentical transplantation. *Pediatrics.* 2012 Jan;129(1):e189–94.

VII- ANNEXES

Annexe 1 : Protocole final de déplétion d'un échantillon de CSP en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ (traitement de 100.10⁶ CMN) :

Tri CD8-CD19 puis tri CCR7

- 1) Prendre un échantillon de CSP équivalent à 100.10⁶ CMN
- 2) Dilution de l'échantillon dans 5 mL de tampon -> **Filtration** -> lavage du filtre avec 5 mL de tampon -> récupération dans un Falcon de 15 mL
- 3) **Centrifugation** 300g pendant 10 min -> récupération du culot
- 4) Resuspendre le culot dans **80 µl tampon/10⁷ CMN**
- 5) **Tri CD8-CD19**
 - a. **20 µl billes CD8/10⁷CMN + 20 µl billes CD19/10⁷ CMN**
 - b. Bien mélanger et incuber 15 min à 4°C au réfrigérateur
 - c. Dilution et reprise dans du **tampon** pour un volume final de 500 µl tampon/10⁸ CMN (si nécessaire)
 - d. Mettre le tube sur l'**AutoMACS Pro**, programme **Possel-s**
 - e. **Fraction négative (2 + volume initial introduit sur l'AutoMACS ml)**
Fraction positive (2 ml)
Réalisation des immunophénotypages sur chaque fraction
 - f. Garder la fraction positive en vue de la mélanger à la fraction négative à l'issue du tri CCR7 et faire les immunophénotypages
- 6) **Centrifugation** 300G 10min de la fraction négative pour passer au tri CCR7 -> récupération du culot
- 7) **Tri CCR7**
 - a. Resuspendre le culot dans **100 µl tampon/10⁷ CMN**
 - b. **10 µl CCR7 biotine/10⁷ CMN**

- c. Incubation 10 min à 4°C au réfrigérateur
- d. Lavage des cellules : ajout de 1-2 mL de tampon/ 10^7 CMN et centrifugation 300G 10 min -> récupération du culot
- e. Resuspendre le culot dans **80 µl tampon/ 10^7 CMN**
- f. **20 µl billes anti-biotine/ 10^7 CMN**
- g. Bien mélanger et 15 min d'incubation à 4°C au réfrigérateur
- h. Remettre en suspension dans qsp 500 µl de tampon/ 10^8 CMN (si nécessaire)
- i. Mettre le tube sur l'**AutoMACS Pro**, programme **Possel**
- j. Récupération de toutes les fractions :

Fraction négative (2 + volume initial introduit sur l'AutoMACS ml)

Fraction positive (2 ml)

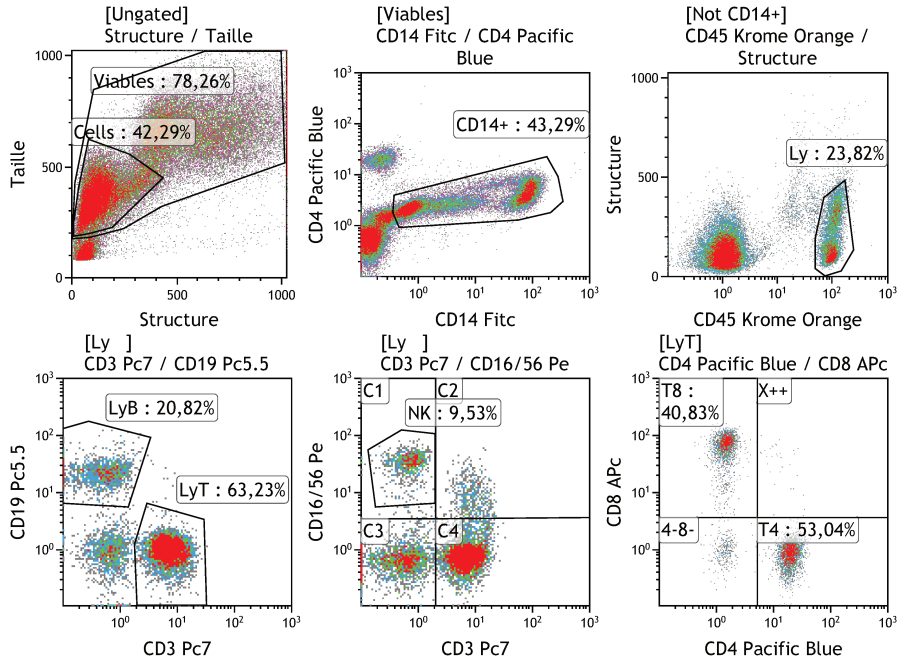
Immunophénotypages sur chaque fraction

- 8) Mélange de la **fraction positive du tri CD8-CD19** et de la **fraction négative du tri CCR7**

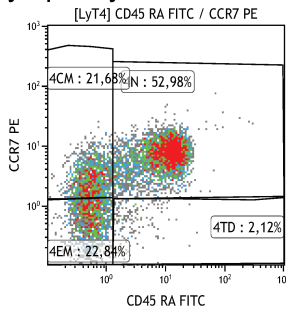
Annexe 2 : Validation par cytométrie en flux de la spécificité du tri CD8-CD19 puis du tri CCR7 incluant le contrôle de la viabilité cellulaire et la préservation des cellules progénitrices CD34⁺ :

A. Caractéristiques cellulaires de la CSP9 avant tri

1) Immunophénotypage standard permettant de distinguer les populations lymphocytaires T CD4⁺, TCD8⁺, B et NK.

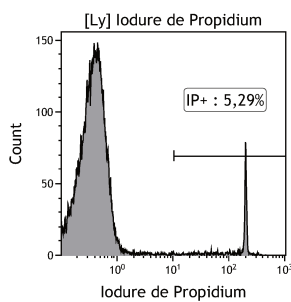


2) Immunophénotypage explorant les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺.

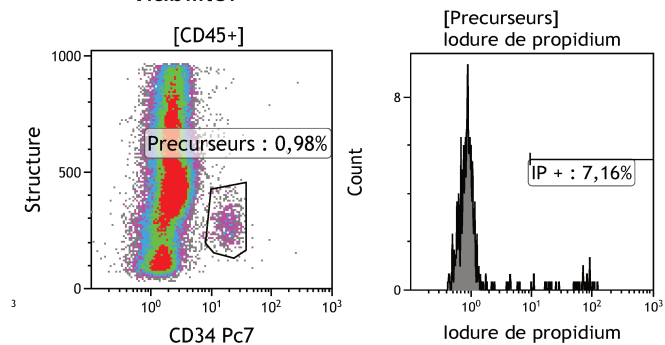


CSP9 AVANT TRI	
VA lymphocytes T CD8 ⁺ triés	5,8.10 ⁶
VA lymphocytes T CD4 ⁺ triés	7,8.10 ⁶
VA lymphocytes B triés	4,6.10 ⁶
VA lymphocytes NK triés	2,1.10 ⁶
VA CD34 ⁺ triés	0,87.10 ⁶

3) Immunophénotypage explorant la viabilité des lymphocytes.

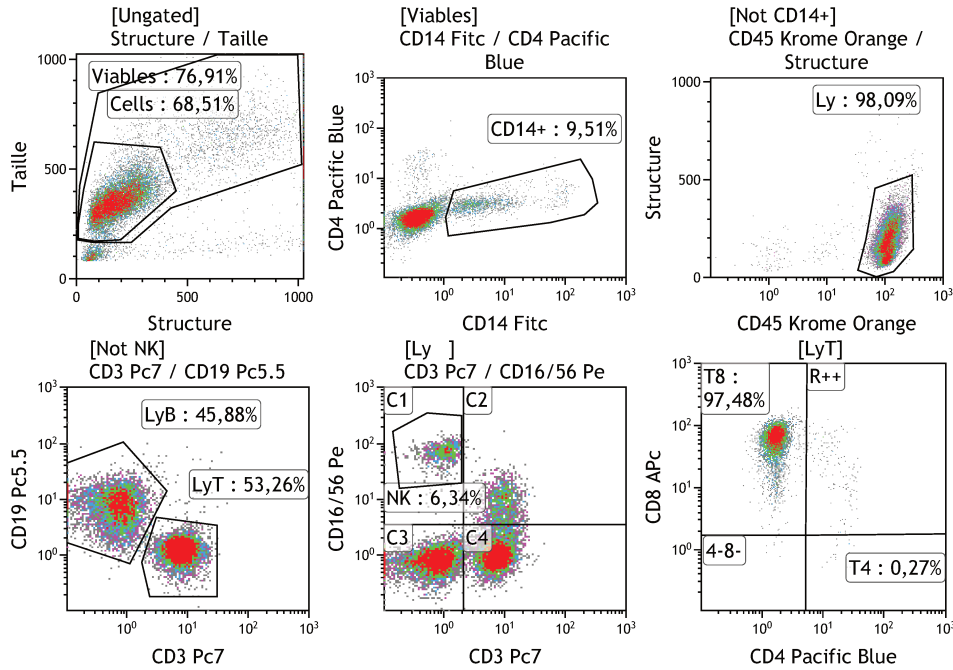


4) Immunophénotypage explorant les cellules progénitrices CD34⁺ et leur viabilité.

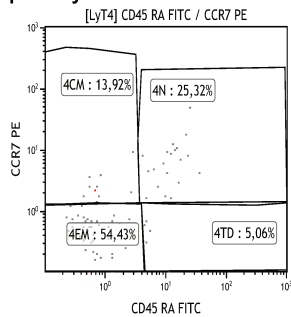


B. Caractéristiques cellulaires de la fraction positive du tri CD8-CD19 (CSP9)

1) Immunophénotypage standard permettant de distinguer les populations lymphocytaires T CD4⁺, TCD8⁺, B et NK.

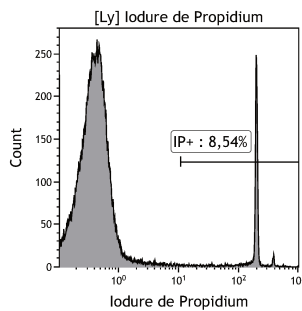


2) Immunophénotypage explorant les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺.

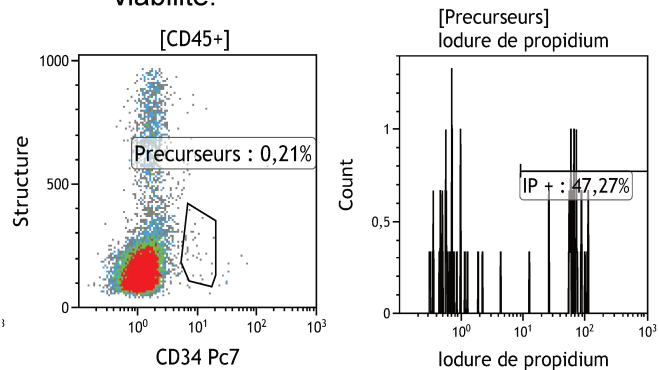


CSP9 Fraction positive du Tri CD8-CD19	
VA lymphocytes T CD8 ⁺	4.3.10 ⁶
VA lymphocytes T CD4 ⁺	0.1.10 ⁶
VA lymphocytes B	3.7.10 ⁶
VA lymphocytes NK	0.5.10 ⁶
VA CD34 ⁺	0,02.10 ⁶

3) Immunophénotypage explorant la viabilité des lymphocytes.

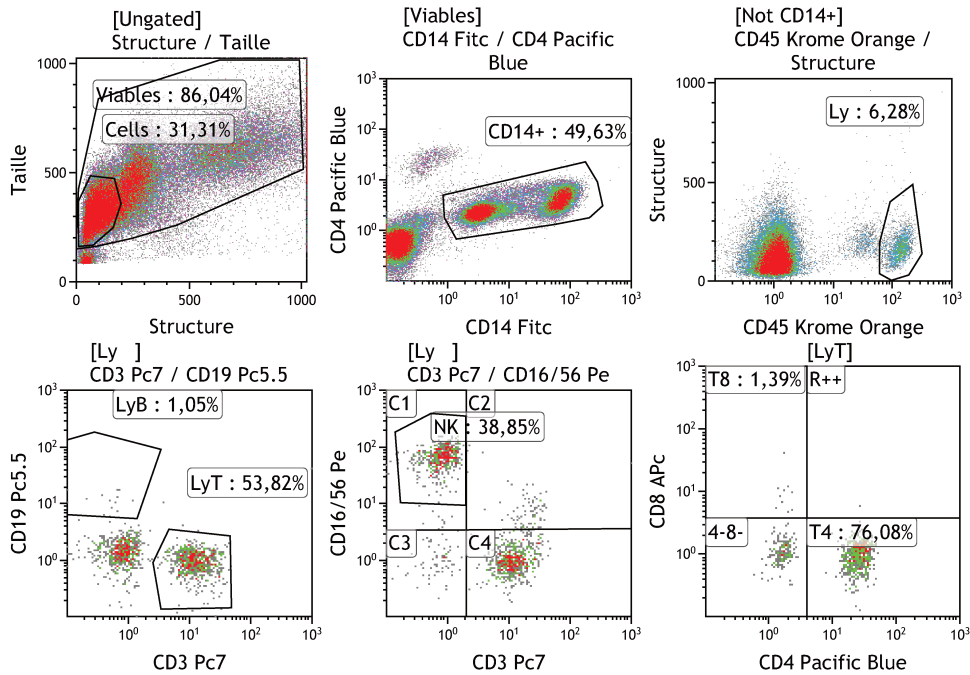


4) Immunophénotypage explorant les cellules progénitrices CD34⁺ et leur viabilité.

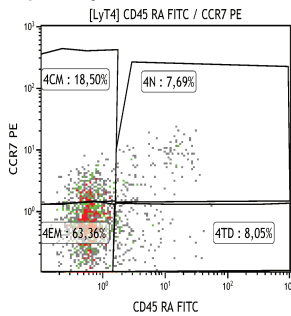


C. Caractéristiques cellulaires de la fraction négative du tri CCR7 (CSP9)

1) Immunophénotypage standard permettant de distinguer les populations lymphocytaires T CD4⁺, TCD8⁺, B et NK.

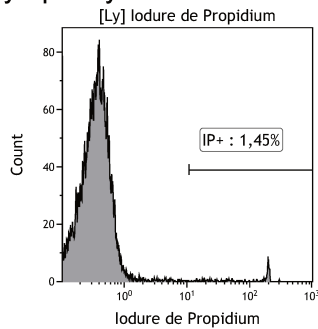


2) Immunophénotypage explorant les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺.

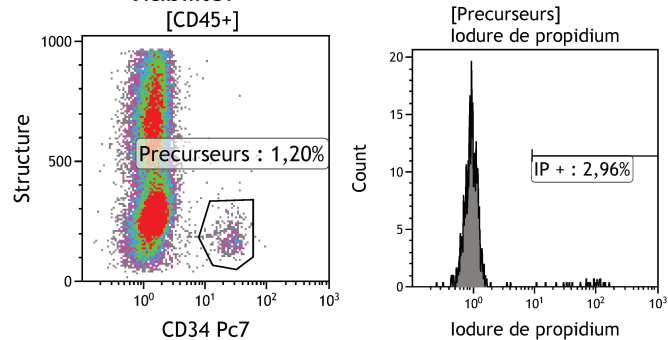


CSP9 Fraction négative du Tri CCR7	
VA lymphocytes T CD8 ⁺	0,02.10 ⁶
VA lymphocytes T CD4 ⁺	0,9.10 ⁶
VA lymphocytes B	0,02.10 ⁶
VA lymphocytes NK	1,0.10 ⁶
VA CD34 ⁺	0,60.10 ⁶

3) Immunophénotypage explorant la viabilité des lymphocytes.



4) Immunophénotypage explorant les cellules progénitrices CD34⁺ et leur viabilité.



Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex
Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Vu le Décret n° 2012-172 du 03 février 2012 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie

Vu la décision du Président de l'Université en date du 14 mai 2012 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Madame ROGEAU Stéphanie**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE sur le sujet suivant :

DEVELOPPEMENT IN VITRO D'UN PROTOCOLE DE DEPLETION AUTOMATISE EN LYMPHOCYTES T CD4+ CCR7+ DE GREFFONS HAPLOIDENTIQUES DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES PERIPHERIQUES EN VUE D'EN REDUIRE LE POTENTIEL ALLOREACTIF

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le
Vendredi 27 mai 2016 à 18h30 - Amphithéâtre Curie

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur(s) :

Madame le Docteur Pauline VARLET
Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA
Hôpital Claude Huriez, CHRU Lille

Madame le Professeur Myriam LABALETTE
Centre de Biologie Pathologie, CHRU Lille

Lille, le 3 mai 2016

Le Doyen

D. CUNY

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'État de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2015/2016

Nom : ROGEAU

Prénom : Stéphanie

Titre du mémoire / thèse :

Développement *in vitro* d'un protocole de déplétion automatisé en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ de greffons haploidentiques de Cellules Souches Hématopoïétiques Périphériques en vue d'en réduire le potentiel alloréactif

Mots-clés :

Greffe haploidentique, Lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺, Réaction du greffon contre l'hôte, Déplétion, Cellules Souches Périphériques

Résumé :

Introduction : En allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, la greffe haploidentique se présente de plus en plus comme une alternative lorsqu'un receveur ne dispose pas de donneur HLA-identique. L'immuno-incompatibilité est élevée dans cette greffe intra-familiale et, pour limiter la réaction du greffon contre l'hôte, des traitements immunosuppresseurs lourds sont administrés chez le patient en post-greffe, tels que le cyclophosphamide, molécule cardiotoxique. Différentes alternatives sont à l'étude pour maîtriser l'alloréactivité de ce type de greffon. Dans ce contexte, notre objectif est d'élaborer un protocole de déplétion partielle et sélective en lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ des greffons haploidentiques de Cellules Souches Périphériques. Leur proportion élevée au sein d'un greffon expose à un risque accru de réaction aiguë du greffon contre l'hôte. **Matériel et méthodes :** Les procédures de tris des lymphocytes sont automatisées sur l'AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec). Les rendements des tris sont évalués par analyse immunophénotypique par cytométrie en flux. **Résultats :** La stratégie d'un double tri positif CD4 CCR7 pour éliminer les lymphocytes T CD4⁺ CCR7⁺ s'est avérée irréalisable en raison du non-détachement des billes couplées aux anticorps anti-CD4 de la surface des cellules CD4⁺. Notre alternative a été de développer une stratégie reposant sur un tri simultané CD8-CD19 suivi d'un tri CCR7 sur la fraction négative issue du premier tri. Tous nos choix dans l'établissement de cette stratégie ont été guidés par une applicabilité future en clinique. **Conclusion et perspectives :** Après avoir mis au point le protocole de déplétion, il reste à vérifier que le greffon déplété remplisse les conditions en matière de préservation du nombre et viabilité des progéniteurs, préservation de l'immunité anti-infectieuse et réduction du potentiel alloréactif. Ce sont les prérequis pour envisager un passage à un essai clinique de phase I/II.

Membres du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU

Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Pharmacie de Lille – CHRU de Lille

Assesseur(s) :

Madame le Docteur Pauline VARLET

Assistant hospitalo-universitaire
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille

Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA

Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille

Directeur de thèse :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Faculté de Médecine de Lille – CHRU de Lille