

**UNIVERSITÉ DE NANTES**

---

**FACULTÉ DE MÉDECINE**

---

Année : 2020

N° 2020-17

**THÈSE**

pour le

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

**HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE**

par

Elise ESNAUD

Née le 11/07/1991

---

Présentée et soutenue publiquement le 09/03/2020

---

**ALTERATIONS PRECOCES DE LA MUQUEUSE COLIQUE APRES GREFFE DE CELLULES SOUCHES  
HEMATOPOIETIQUES ALLOGENIQUES : ETUDE PROSPECTIVE SUR 19 PATIENTS**

---

Président : Monsieur le Professeur Emmanuel CORON

Directeur de thèse : Madame la Docteure Lucille QUENEHERVE

## Je remercie :

**Le Président du Jury, le Professeur Emmanuel CORON**, pour me faire l'honneur de présider ma thèse, pour m'avoir fait confiance, pour votre enseignement en gastroentérologie et en particulier en endoscopie, pour votre soutien et aide précieuse dans tous mes projets. Soyez assuré de mon grand respect et de ma reconnaissance.

**Ma directrice de thèse, le Docteur Lucille QUENEHERVE** pour m'avoir proposé ce projet, pour m'avoir fait confiance. Tu as été une directrice de thèse en or, aidante, disponible, encourageante, j'ai eu beaucoup chance de travailler avec toi sur ces travaux depuis près de 2 ans maintenant ! Au-delà de cette thèse, merci d'avoir été Ma super chef de clinique, pour tes connaissances transmises, pour ta constante bienveillance, ta constante bonne humeur, ta gentillesse, pour nos longues contre-visites autour d'un thé qui ont largement adoucies mon semestre en conventionnel.

**Le Professeur Arnaud BOURREILLE**, d'avoir accepté de faire partie de mon Jury, pour votre compagnonnage durant tout mon internat, pour m'avoir formée en gastro-entérologie et particulièrement dans le domaine des maladies inflammatoires d'abord durant mon stage en UMA puis lors de mon stage en gastro-entérologie. Merci d'avoir été un chef d'unité encadrant et disponible pour moi, j'ai beaucoup appris à vos côtés et je vous en suis très reconnaissante.

**Le Professeur Patrice CHEVALLIER**, d'avoir accepté d'être membre de mon Jury, de votre aide pour le recrutement des patients de notre étude. C'est un honneur pour moi d'avoir parmi mon Jury un expert de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, soyez assuré de tout mon respect.

**Le Professeur Cécile BOSSARD**, d'avoir également accepté de faire partie de mon Jury, d'apporter un œil d'anatomopathologiste experte sur nos travaux. Soyez assurée de mon profond respect.

\*\*\*

**Le Docteur Jérôme GOURNAY**, pour votre encadrement pendant mes quatre ans d'internat, pour votre lutte pour l'amélioration de qualité de vie des internes et pour votre soutien nous permettant à chacun de poursuivre notre formation après l'internat au sein du CHU en tant que chef de clinique ou assistant.

**Le Docteur Isabelle ARCHAMBEAUD**, pour ta pédagogie, pour tes qualités humaines, pour mon semestre aux soins intensifs, pour ton soutien que je n'oublierai pas.

**Le Docteur Caroline TRANG**, pour mon premier stage à l'UMA, pour la transmission de ton savoir sur les MICI et de ta passion pour notre métier.

**Les Docteurs Marc LERHUN et Nicolas MUSQUER** pour votre formation en endoscopie, votre bienveillance et les débuts du SEDI qui resteront un très bon souvenir de mon internat.

**Tous les autres médecins du service, le Docteur Yann TOUCHEFEU, le Docteur Estelle CAUCHIN, le Docteur Adam JIRKA, Le Docteur Solange PECOUT, le Docteur Mathurin FLAMANT, le Docteur Christelle LEGOUIL, le Professeur Tamara MATYSIAK, le Professeur Stanislas BRULEY DES VARANNES** pour votre enseignement, pour votre écoute et disponibilité auprès de chacun des internes que ce soit le jour ou la nuit lors de nos gardes.

**Mes chefs de cliniques adorés**, mes copains avec qui j'ai appris et surtout avec qui j'ai beaucoup ri. Venir travailler avec vous a été chaque jour un pur plaisir, vous le savez. **Nicolas**, pour tes compétences et ton humour évidemment, mon semestre aux soins avec toi, Miloud et Anaïs restera mémorable. **Mathieu**, pour ta gentillesse, ton oreille toujours disponible, nos « bitchages » que j'adore mais aussi ta rigueur que je prends comme modèle. **Sarah**, pour ton professionnalisme, ta spontanéité et ta folie qui égaiant les couloirs de l'IMAD et qui m'égaient !! **Annie**, pour ta rigueur, pour ta sympathie et pour tes éternels « ok salut. ». **Céline**, pour ta patience et ta gentillesse.

**Mes anciennes co-internes et actuelles chefs, Marion, Maeva et Cath**, pour m'avoir si bien accueillie et coachée lors de mes premiers semestres, pour votre fraîcheur, votre sourire, votre dynamisme, vous êtes parfaites !

**A mes co-internes, Marine, Astrid, Alix, Oriane, Laure, Lucie, Hannah, Quentin, Juliette, Pierrine, Astrid, Samuel, Victor, Hugo, Margaux et les autres**, pour votre bel esprit d'équipe, votre solidarité, la bonne ambiance du groupe qui font que les journées passent vite !

**Toutes les infirmières et infirmiers, toutes les aides-soignantes et aides-soignants, les ASH** du 2eme sud et du 2eme est, d'endoscopie, de jour et de nuit. Vous faites un travail épatant, vous m'avez toujours beaucoup soutenue et vous m'avez fait confiance. J'ai appris énormément à vos côtés, de vos qualités humaines, de votre humilité. Je vous suis infiniment reconnaissante. Et un énorme big-up aux équipes de nuit qui me font rire et avec qui je refais le monde autant que je travaille pendant mes gardes !

**L'ensemble de mes maîtres de stages du CHU de Rennes** lors de mon externat, auprès desquels je me suis formée et qui ont été d'excellents pédagogues et transmetteurs de leur savoir et de leur passion.

**Toute l'équipe du centre René Gauducheau** qui m'ont appris la prise en charge complexe du patient en oncologie.

**L'équipe médicale et paramédicale de Cholet**, pour m'avoir chaleureusement accueillie et formée à la gastroentérologie le temps d'un semestre.

**L'équipe de radiologie du CHU**, pour leur sympathie et leur accueil ce semestre.

\*\*\*

**Clémence, Anne-Blanche, Aude, Pauline, Pauline et Léopoldine.** Mes amies, mes copines, mes confidentes de toujours, mes « Bonnasses », celles que j'ai rencontrées le premier jour de mon lycée et que je n'ai plus quittées. Celles qui me connaissent par cœur, qui me permettent de m'échapper du monde médical, celles qui me font rire, celles avec qui je partage tant. Merci pour tout, pour notre amitié, indéfectible.

**Julia**, ma plus vieille amie, la plus fidèle, la plus singulière.

**Mes amis de Rennes alias « Les gros »** rencontrés quelques jours après l'obtention de notre Gral, ce concours de P1 : **Edin**, pour ton humour gras (que j'adore!!) et ta bonne humeur, **Tatan** parce que tu es le plus fort, **mon fat Chris** pour tes blagues pas drôles, ta joie de vivre et ton rire communicatif, **Arnaud**, pour ta folie et ton excentricité, **Antoine** qui mérite la palme de mon copain le plus drôle, **Simon**, parce que tu es le plus beau, **Juliette**, pour ta douceur et ta simplicité, **Léa**, pour ta gentillesse et ta fiabilité, **Léa**, pour ton caractère bien trempé qui me manque, et **Caro, Marine, Cassou, Marwanne, Gaspard, Hugo, Chacha**. Dix ans d'amitiés, d'un travail en commun qui nous fédèrent, d'innombrables soirées, de délires, de vacances à Bisca, Valence, au ski, des week-ends entre gros et aujourd'hui des mini-gros qui viennent agrandir la bande. Vous êtes mes piliers, je suis heureuse de tous vous avoir encore auprès de moi aujourd'hui.

**Ma grosse Mathilde**, toi mon amie qui me fait tellement rire, avec qui j'ai préparé chacun des examens de nos longues années d'études, avec qui j'ai tout partagé de mes histoires d'étudiante, avec qui j'ai poncé le parquet du Stanley tous les jeudis soirs de l'externat, celle avec qui j'ai adoré vivre à Nantes, celle avec qui j'ai rempli des caddies de couches et de perceuses (c'est drôle non ??)... Mon amie quoi.

**Ma grosse Gwendo**, mon amie de concours et bien plus !! Un binôme qui nous a permis de décrocher notre P1 et de réussir l'ECN ! Je sais que sans toi, ta rigueur, ta générosité, ta gentillesse, mais aussi sans nos tartes, nos pauses terrasse, ton hospitalité, ces six années à Rennes n'auraient pas été aussi chouettes. La petite Juliette sera heureuse avec les parents qu'elle a.

**Ma grosse Mimi**, celle qui n'a jamais de problème, qui aime tous ceux qui l'entourent et tout ce qu'elle entreprend, celle au un sourire permanent, communicatif et fédérateur. Tout le monde devrait avoir une grosse mimi dans sa vie.

**Miloud**, mon co-interne de toujours mais surtout mon ami. Merci pour ce semestre au 2eme sud et tous les autres, pour nos pause clopes entre 2 CRH, pour nos discussions interminables qui nous faisaient

sortir à pas d'heure, pour nos pétages de câbles, pour nos fous rires, pour ton humour pas drôle (#Milourd), pour ta gentillesse, ton humilité.

**Louise**, mon amie, collègue, colloc'. Il n'y pas meilleur socle d'amitié que le fêtes de Bayonne !

**Lara**, l'amie que chacun devrait avoir, celle qui écoute et vous fait rire.

**Xavier**, mon ami le plus fidèle, parce que tu me fais mourir de rire parfois sans le vouloir, faute ou grâce à ton hypocondrie légendaire.

**Max**, ma première rencontre à l'internat à Nantes, mon ami depuis.

**Elliot, Arthur, Antho**, que je vois moins mais qui comptent toujours.

\*\*\*

**Mon papa et ma maman**, mes parents chéris, vous qui me couvrez d'amour, vous qui m'avez appris le courage, l'honnêteté, l'humilité et toutes ces belles valeurs qui vous représentent si bien, vous qui êtes un modèle si parfait pour moi.

**Rose**, ma petite sœur adorée, mon amie, pour ta force, ton intelligence, ta gentillesse, pour le formidable médecin que tu seras et dont je suis très fière.

**Clément**, le plus adorable des petits frères, d'humeur constante, d'une gentillesse inégalable.

**Mes oncles et tantes**, mon oncle chéri Jean-Michel pour m'avoir transmis tôt les valeurs du travail mais aussi pour nos délires et nos virées festives, ma tata Marie-Cécile avec qui j'ai tout partagé de mon enfance et adolescence et qui me connaît si bien, Philippe mon parrain, Sylvie ma marraine, Françoise, Béatrice.

**Mon papy et mes petites mamies** qui me chouchotent depuis je suis toute petite.

**Mes cousins et cousine**, Benoît, Thomas, Quentin, Alexandre, Corentin, Mathilde, Valentin et Nathan.

**Les Pouëssels**, pour ces innombrables bons moments qui ont bercés mon enfance, mon adolescence et qui continuent de me ravir.

**Sylvie, Jean-Do, Tristan, Léo et Sarah** pour m'avoir fait une chaleureuse place dans votre belle famille.

\*\*\*

**Dominique**, qui était un parfait modèle de courage et d'humanité, qui était ce médecin qui nous devrions tous être. J'espère que tu serais fier de moi aujourd'hui.

\*\*\*

**Samuel**, mon amour, toi qui rends chaque jour ma vie plus belle.

# Table des matières

Partie 1 : Mini-revue.....	10
Abréviations.....	11
Introduction.....	12
1/ Définitions- Epidémiologie.....	12
2/ Facteurs de risques .....	12
Physiopathologie .....	13
1/ Comment se développe une GVH ? .....	13
a. Les prérequis .....	13
b. L'activation des cellules présentatrices d'antigènes .....	14
c. L'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des lymphocytes T du donneur.....	14
d. La destruction du tissu cible .....	15
2/ Rôle de la muqueuse intestinale.....	16
3/ Rôle du microbiote intestinal.....	16
Manifestations cliniques de la GVH digestive .....	17
Diagnostic .....	18
1/ Endoscopie digestive conventionnelle.....	18
2/ Histologie .....	20
3/ Imagerie abdominale .....	20
4/ Endomicroscopie confocale .....	21
5/ Vidéocapsule du grêle.....	21
6/ Biomarqueurs.....	22
Diagnostiques différentiels .....	23
1/ Affections iatrogènes .....	23
2/ Infections.....	23
3/ Colite neutropénique .....	24
4/ Syndrome de colite après greffe du cordon (SCC).....	25
5/ Diagnostiques différentiels devant des symptômes digestifs hauts.....	25
Traitements .....	25
1/ Traitement prophylactique .....	25
2/ Traitement curatif de première intention .....	26
3/ Traitement de seconde intention .....	26
4/ Soins de support .....	27
Conclusion .....	27

BIBLIOGRAPHIE.....	28
Tableaux .....	35
Tableau 1 : Facteurs de risque de GVH.....	35
Tableau 2 : Score modifié de Glücksberg. ....	36
Tableau 3 : Classification de Freiburg des lésions endoscopiques de GVH digestive .....	36
Tableau 4 : Diagnostic histologique de GVH digestive .....	37
Figures .....	38
Figure 1 : Physiopathologie de la GVH aiguë.....	38
Figure 2 : Aspects anatomopathologiques.....	40
Partie 2 : Etude Clinique .....	41
Abbreviations.....	42
Introduction.....	43
Methods .....	46
Study design and patients. ....	46
Study protocol .....	46
Diagnostic of GVHD .....	47
Rectosigmoidoscopy and pCLE procedures.....	48
Analysis of pCLE parameters .....	48
Measurement of paracellular permeability .....	49
Assay of tissue cytokines .....	50
Statistical analysis.....	50
Results .....	51
Patients.....	51
GVHD characteristics .....	51
Rectosigmoidoscopy and pCLE .....	52
Crypt architecture, density, distribution and vessels in pCLE .....	52
Paracellular permeability.....	52
Pro-inflammatory cytokines in explant culture.....	53
Discussion .....	53
Table 1: Subjects' characteristics. ....	59
REFERENCES.....	60
Figures .....	63
Figure 1: Analyze of cryptometry parameters in pCLE.....	63
Figure 2: Flow chart.....	64
Figure 3: Crypt architectural parameters in pCLE. ....	65



Figure 4: Crypt density and distribution in pCLE. ....	66
Figure 5: Vessel parameters of the crypts in pCLE .....	67
Figure 6: Paracellular permeability.....	67
Figure 7: Pro-inflammatory cytokines in colonic explant cultures.....	68

## **Partie 1 : Mini-revue**

La maladie du greffon contre l'hôte digestive : ce que le gastro-entérologue doit savoir.

## Abréviations

GVH : Graft versus host - Maladie du greffon contre l'hôte

GVL : Graft versus leukemia

HLA : Human leucocyte antigen - Antigène de leucocytes humains

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

LPS : Lipopolysaccharide

CSI : Cellules souches intestinales

EOGD : Endoscopie oeso-gastroduodénale

RS : Rectosigmoïdoscopie

EMC : Endomicroscopie confocale

VCE : Vidéocapsule endoscopique du grêle

CMV : Cytomégalovirus

Reg3 $\alpha$  : protéine régénératrice dérivée des îlots 3 $\alpha$

ST2 : Suppresseur de la tumorigénicité 2

TNFR1 : Récepteur 1 du TNF

MAP : Algorithme de probabilité MAGIC

MMF : Mycophénolate mofétil

SCC : Syndrome de colite du cordon

# Introduction

## 1/ Définitions- Epidémiologie.

La maladie du greffon contre l'hôte (GVH) aiguë et/ ou chronique est une complication fréquente et grave de la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, représentant la seconde cause de décès chez ces patients, après la rechute de la maladie hématologique initiale (1). L'incidence de la GVH aiguë digestive est rapportée chez 30 à 60% des patients allogreffés selon les séries (2–4).

La forme aiguë de GVH résulte de la réaction des lymphocytes T immunocompétents du donneur contre les tissus sains de l'hôte, entraînant une réaction inflammatoire plus ou moins sévère qui touche particulièrement la peau, le foie et le tube digestif.

La forme chronique de GVH émane de mécanismes complexes et multiples (réaction inflammatoire, réaction immunitaire à médiation cellulaire et /ou humorale, atteinte fibrosante). Elle se traduit par une atteinte d'un ou plusieurs organes, proche de celle observée dans des pathologies auto-immunes telles que la sclérodémie, le syndrome de Sjögren, la cholangite sclérosante primitive ou la bronchiolite oblitérante (5).

La classification en GVH aiguë ou chronique en fonction de l'apparition des lésions avant ou après le 100ème jour post-allogreffe est actuellement considérée comme obsolète. En effet, l'utilisation de régimes de conditionnement d'intensité réduite peut conduire à l'apparition tardive de lésions de GVH aiguë.

La classification élaborée par un consensus d'experts en 2005 (5) distingue :

- **GVH aiguë "classique"** : signes cliniques de GVH dans les 100 premiers jours suivant l'allogreffe.
- **GVH aiguë persistante ou récurrente** : apparition de signes cliniques de GVH aiguë sans signe de GVH chronique au-delà du 100ème jour après allogreffe. Forme souvent décrite à l'arrêt des immunosuppresseurs.
- **GVH chronique "classique"** : Apparition de manifestations typiques de GVH chronique sans signe de GVH aiguë à n'importe quel moment après la greffe.
- **Overlap syndrome ou syndrome de chevauchement** : forme mixte associant atteintes de GVH aiguë et chronique à n'importe quel moment après la greffe.

## 2/ Facteurs de risques

Plusieurs facteurs de risque de développer une GVH ont été identifiés et sont résumés dans le Tableau 1. Classiquement, les deux facteurs de risque majeurs sont un donneur non apparenté (donneur du fichier)

et une greffe avec incompatibilité HLA (3). A noter qu'un antécédent de GVH aiguë est un facteur de risque de développer une GVH chronique (6).

## Physiopathologie

### 1/ Comment se développe une GVH ?

#### *a. Les prérequis*

La greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques est largement utilisée pour le traitement de tumeurs malignes ou bénignes hématologiques. L'allogreffe (donneur différent du receveur) a une triple action : une action anti-tumorale par la chimiothérapie +/- radiothérapie de conditionnement, la reconstitution hématopoïétique à partir des cellules greffées saines et la reconstitution immunologique qui participe à l'éradication des cellules malignes du receveur (effet graft versus leukemia, GVL). L'allogreffe est un traitement associé à une morbi-mortalité non négligeable de par les effets du conditionnement et de par les conflits immunologiques qui en résultent, en particulier ceux à l'origine de la GVH.

Le type de donneur est défini selon la compatibilité HLA (Human leucocyte antigen = antigène de leucocytes humains) entre donneur et receveur : une greffe est dite géno-identique si le donneur est HLA compatible et intra-familial et phéno-identique si le donneur est HLA compatible et issu du fichier de donneurs volontaires. Aujourd'hui des donneurs à moitié compatible sur le plan HLA (donneur haplo-identique) issus de la famille proche sont également considérés en l'absence de donneurs compatibles. L'utilisation de fortes doses de cyclophosphamide en post-greffe précoce permet d'éviter des GVH graves dans ce contexte (7). Les cellules souches hématopoïétiques (greffon) sont obtenues à partir du sang périphérique après mobilisation des cellules souches par des facteurs de croissance ou à partir de prélèvements de moëlle osseuse, beaucoup plus rarement à partir du sang de cordon (qui constitue donc un autre « donneur » potentiel pour les patients).

Lors d'une allogreffe, le patient est hospitalisé dans une chambre stérile à flux laminaire. La première étape est la réalisation du conditionnement qui correspond à un traitement de chimiothérapie +/- irradiation corporelle totale qui a pour but la destruction de la moëlle du patient (soit complète, le conditionnement est alors dit myéloablatif, soit incomplète, le conditionnement est alors dit atténué) et la destruction du système immunitaire du patient pour éviter le rejet du greffon par les cellules immunitaires de l'hôte. Le conditionnement peut aussi avoir une action anti-tumorale. Le greffon est transfusé à la fin du conditionnement. Une période d'aplasie, liée au conditionnement, s'ensuit d'environ

15 jours à 3 semaines après la greffe. L'efficacité de l'allogreffe est liée à l'effet GVL (Graft-versus-leukemia) médié par les lymphocytes T du greffon. L'introduction du traitement immunosuppresseur pour prévenir la GVH débute en général pendant le conditionnement.

Quelques éléments essentiels permettent de comprendre le développement d'une GVH (8).

Le greffon contient des cellules immunologiquement compétentes, les lymphocytes T, et le receveur exprime des antigènes tissulaires différents de celui du greffon. Ainsi, les lymphocytes T du donneur vont amorcer une réponse inflammatoire après contact avec ces antigènes qui leur semblent étrangers, présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur.

Le développement d'une GVH aiguë est en grande partie lié au degré d'inadéquation entre les protéines HLA du donneur et ceux du receveur. Ils doivent donc idéalement être appariés, au moins au niveau HLA A-B-C et DRB1. Malgré l'appariement HLA, plus d'un tiers des patients développe une GVH aiguë en raison de différences situées en dehors des loci HLA, ce sont les antigènes mineurs d'histocompatibilité (9,10).

Le développement de la GVH aiguë peut être conceptualisé en 3 étapes séquentielles, comme décrit par Ferrara et collaborateurs (9) : l'activation des cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte (CPA), l'activation des lymphocytes T du donneur et la destruction du tissu cible chez l'hôte (Figure 1).

#### *b. L'activation des cellules présentatrices d'antigènes*

La maladie hématologique sous-jacente, les infections dans un contexte d'immunosuppression et le régime de conditionnement pré-greffe entraînent des lésions tissulaires chez le receveur. Cela va favoriser la libération d'antigènes tissulaires, de cytokines régulant la migration des cellules immunitaires (chimiokines) et de cytokines pro-inflammatoires. Cela entraîne également une expression accrue des molécules d'adhésion et des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité au niveau des CPA. L'ensemble de ces phénomènes, considérés comme « des signaux de danger », vont activer les CPA du receveur.

Le tube digestif joue un rôle majeur dans cette phase. En effet, les lésions muqueuses intestinales, causées notamment par le conditionnement, favorisent la translocation de produits microbiens comme le lipopolysaccharide (LPS) qui participe à l'activation des CPA du receveur (11).

#### *c. L'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des lymphocytes T du donneur.*

Les lymphocytes T du donneur reconnaissent les complexes peptides-antigènes majeurs ou mineurs d'histocompatibilité présentés par les CPA via le récepteur des cellules T. Ce signal entraîne une activation de ces lymphocytes T qui se différencient, prolifèrent en cellules effectrices, et migrent dans

les tissus d'intérêt. Le tissu lymphoïde secondaire intestinal est probablement le site initial de l'interaction entre les CPA activées et les lymphocytes T du donneur (12).

De plus, l'activation des cellules immunitaires entraîne la transcription de gènes codant pour de nombreuses protéines, notamment des cytokines pro-inflammatoires et leurs récepteurs. Les cytokines Th1 (IFN $\gamma$ , IL2, TNF $\alpha$ ) pro-inflammatoires sont libérées en grande quantité. Le TNF- $\alpha$  joue un rôle particulièrement important : il active les CPA et potentialise la présentation de l'allo-antigène, il recrute les cellules effectrices vers les organes cibles en induisant la production de chimiokines pro-inflammatoires et il provoque directement une nécrose tissulaire par apoptose.

Il existe un phénomène d'équilibre grâce aux lymphocytes T régulateurs qui peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T conventionnels et prévenir la survenue de GVH dans le modèle murin(13). Ils sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ ) et peuvent inhiber les CPA à leur contact.

#### *d. La destruction du tissu cible*

La phase effectrice de ce processus est une cascade complexe impliquant effecteurs cellulaires et cytokines pro-inflammatoires pour aboutir à la destruction des tissus cibles par les effecteurs cellulaires.

Les effecteurs cellulaires de la GVH aiguë sont principalement les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules Natural Killer. Les lymphocytes T cytotoxiques utilisent préférentiellement les voies d'élimination cellulaire Fas/FasL et perforine/granzyme au cours de la GVH.

La protéine inflammatoire macrophage-1alpha (MIP-1 $\alpha$ ), des chimiokines (CCL2-5, CXCL2, ...) ainsi que certaines intégrines sont surexprimées, favorisant le recrutement des effecteurs cellulaires vers les organes cibles au cours de la GVH expérimentale(14). La surexpression de l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 et son ligand MadCAM-1, jouent un rôle important dans le recrutement des cellules T du donneur vers les plaques de Peyer lors de la GVH digestive.

De plus, les LPS peuvent stimuler la sécrétion de cytokines inflammatoires par le biais des Toll-like récepteurs.

Le tractus gastro-intestinal est particulièrement sensible aux dommages causés par le TNF- $\alpha$  et joue un rôle majeur dans l'amplification et la propagation de la « tempête cytokinique » caractéristique de la GVH aiguë.

## **2/ Rôle de la muqueuse intestinale**

Les interactions entre la muqueuse intestinale et son microenvironnement, notamment les cellules immunitaires et le microbiote intestinal, jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la GVH aiguë(15).

Tout d'abord, comme évoqué précédemment, les cellules épithéliales intestinales sont particulièrement sensibles au conditionnement pré-greffe, qui a une action cytotoxique directe sur ces cellules et sur les jonctions serrées qui les lient, entraînant une augmentation de la perméabilité intestinale. Cette augmentation est un facteur de risque de GVH(15).

De plus, d'autres types cellulaires semblent également altérés par le conditionnement et ont été examinés dans des modèles murins (15) : les cellules caliciformes, qui sécrètent le mucus recouvrant l'épithélium et participent à la fonction de barrière intestinale et les cellules de Paneth, qui ont une fonction de support des cellules souches intestinales (CSI). En effet, les cellules de Paneth produisent d'une part des facteurs de croissance des CSI et d'autre part stockent une grande variété de puissantes molécules antimicrobiennes actives contre les bactéries intestinales. Une de ces molécules, la protéine régénératrice dérivée des îlots 3 $\alpha$  (Reg3 $\alpha$ ), a été identifiée comme biomarqueur de la GVH digestive et semble prédictive du pronostic de la GVH lorsqu'elle est combinée à d'autres biomarqueurs plasmatiques, notamment le suppresseur de la tumorigénicité 2 (ST2) (16).

Enfin, les lésions des CSI sont aussi un des éléments majeurs de la physiopathologie de la GVH digestive. Ces cellules, situées à la base de la crypte intestinale sont capables de générer tous les types de cellules de l'épithélium intestinal et sont donc essentielles à l'homéostasie intestinale et à la régénération cellulaire. Récemment, des marqueurs moléculaires spécifiques des CSI (tels que Olfm4 et Lgr5) ont été identifiés. Leur perte a été mise en évidence dans l'intestin grêle de souris allogreffées (17). De plus, il a été démontré qu'un traitement prophylactique par R-spondin-1, facteur de croissance des CSI, a un rôle protecteur des lésions dues à la GVH et au conditionnement(17), illustrant ainsi que des stratégies de préservation des CSI pourraient constituer des pistes de traitement intéressantes.

## **3/ Rôle du microbiote intestinal**

Des modifications du microbiote ont été mises en évidence chez les patients allogreffés avant et au cours d'une GVH aiguë, notamment d'importantes variations au sein de différents groupes de bactéries (18). Ainsi les Entérobactéries à Gram négatif (*Escherichia*, *Klebsiella* et *Enterobacter*) qui ont un rôle pro-inflammatoire et les Lactobacillales à Gram positif (*Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*) paraissent augmentées dans le microbiote de patients ayant une GVH (19). En parallèle, on observe une diminution des bactéries à Gram positif anaérobies, y compris celles de la classe des Clostridia, qui ont tendance à réduire les phénomènes de GVH. Ces modifications pourraient être dues à la réduction des



apports nutritionnels oraux, aux différentes lignes d'antibiothérapie, ou encore à une perturbation de la production de peptides antimicrobiens par les cellules intestinales (15).

Dans ce contexte, les métabolites produits par ces bactéries sont altérés, notamment le butyrate, un acide gras à chaîne courte nécessaire à l'intégrité de la muqueuse intestinale et favorisant la différenciation des lymphocytes T régulateurs (20). Le butyrate permet la préservation de l'acétylation des histones en inhibant l'histone désacétylase. Or, on sait que les cellules épithéliales intestinales présentent une acétylation réduite des histones lors d'une GVH, s'expliquant notamment par un taux significativement appauvri de butyrate dans les tissus intestinaux. Cela a été mise en évidence dans le modèle murin de GVH (21). Ainsi, une alimentation orale enrichie en butyrate ou l'introduction d'un mélange de Clostridia produisant du butyrate semble permettre de restaurer l'acétylation des histones épithéliaux et améliorer la survie des souris présentant une GVH aiguë (15,21).

De plus, une perte de la couche de mucus associée à une diminution de l'intégrité de la barrière intestinale a récemment été observée après traitement antibiotique à large spectre chez des souris allogreffées présentant une GVH aiguë, ce qui indique que des modifications de la composition du microbiote intestinal peuvent avoir un effet sur l'intégrité de la couche de mucus (15,22).

## **Manifestations cliniques de la GVH digestive**

La GVH aiguë peut toucher n'importe quel segment du tractus digestif (23). L'atteinte grêlique et/ou colique est la plus fréquente, se traduisant principalement par une diarrhée, dont les mécanismes sont multiples, essentiellement sécrétoire secondaire aux lésions muqueuses, mais aussi osmotique par l'effet de glucides intraluminaux non réabsorbés ou encore par défaut de réabsorption de sels biliaires en cas d'atteinte iléale terminale (24). D'autres signes fonctionnels peuvent être présents telles que des douleurs abdominales à types de crampes, un syndrome occlusif sur iléus fonctionnel et des symptômes digestifs hauts en cas d'atteinte étendue. Des signes généraux tels qu'une anorexie et une perte de poids sont souvent associés (10,25). L'atteinte digestive haute isolée est plus rare et se manifeste par une dyspepsie, une dysphagie ou une odynophagie voire des douleurs thoraciques, des nausées ou des vomissements, une anorexie sans diarrhée (26). Dans les formes graves, des hémorragies digestives sur ulcérations muqueuses peuvent survenir (27).

Ces symptômes sont aspécifiques et sont difficiles à distinguer des effets secondaires du conditionnement à la phase aiguë. S'ils persistent en sortie d'aplasie, une GVH aiguë doit être recherchée (24).

La sévérité de la GVH digestive est évaluée cliniquement et classée du grade I, défini par une diarrhée dont le volume est compris entre 500 et 1000mL par jour, parfois accompagnée de nausées et de vomissements, au grade IV où une diarrhée profuse est associée à des douleurs abdominales intenses plus ou moins associées à un iléus(23,28). La sévérité de la GVH aiguë est cotée selon l'échelle modifiée de Glücksberg (Tableau 2). Les atteintes cutanée, hépatique, digestive sont notées du stade 0 (pas d'atteinte) au stade 4 (atteinte la plus sévère) et l'addition de ces stades donne un grade global coté lui aussi de 0 à 4 (23,28).

## **Diagnostic**

La GVH digestive est un diagnostic avant tout clinique et un diagnostic d'élimination. Les examens digestifs peuvent être utiles au diagnostic mais les signes retrouvés ne sont pas spécifiques. Le diagnostic repose donc sur un faisceau d'arguments après avoir éliminé les causes potentielles pouvant expliquer la clinique.

### **1/ Endoscopie digestive conventionnelle**

L'examen endoscopique de la muqueuse digestive chez des patients ayant une GVH digestive peut être normal (29) ou montrer des lésions aspécifiques telles qu'un œdème muqueux, un érythème, des érosions ou des ulcérations. Plusieurs classifications sont utilisées dans les études (30,31), la plus ancienne et la plus utilisée étant la classification de Freiburg (Tableau 3) (30).

Les données sont discordantes concernant la corrélation entre la sévérité de l'atteinte endoscopique et celle de l'atteinte histologique. Une étude a montré une bonne corrélation entre les données endoscopiques et histologiques (32) mais d'autres travaux plus récents (29,31) mettent en évidence une association médiocre entre les scores cliniques, endoscopiques et anatomopathologiques.

Les données sont également discordantes sur le rendement diagnostique des sites à prélever. Les études semblent s'accorder sur le fait que les biopsies duodénales sont plus rentables que les biopsies gastriques pour le diagnostic de GVH digestive lors d'une endoscopie oeso-gastroduodénale (EOGD) (30,33). En revanche, certaines études montrent qu'une rectosigmoidoscopie (RS) est aussi rentable qu'une iléocoloscopie totale avec biopsies iléales (34,35), alors que d'autres mettent en évidence une meilleure rentabilité de l'iléocoloscopie par rapport à une RS seule, les formes de GVH sévères atteignant volontiers l'intestin grêle (33). Quoiqu'il en soit, le rendement diagnostique d'une EOGD avec biopsies duodénales associée à une RS est équivalent à celui d'une iléocoloscopie (30,35).

Enfin la rentabilité diagnostique des différents examens endoscopiques ne dépend pas du type de symptômes prédominants. En effet, la sensibilité d'une EOGD semble équivalente à celle d'une RS en cas de diarrhée comme en cas de prédominance de signes digestifs fonctionnels hauts (36). Quel que soit le type de symptômes, la sensibilité de l'EOGD va de 76 à 89% et celle de la RS de 72 à 95%.

En pratique, conformément aux recommandations de la société américaine d'endoscopie digestive (ASGE) (37), on peut proposer la réalisation en première intention d'une RS en cas de diarrhée prédominante ou d'une EOGD en cas de nausées /vomissements prédominants avec biopsies des zones pathologiques et biopsies étagées segmentaires systématiques (37,38). Il faut réaliser au moins 4 biopsies du côlon gauche et 4 biopsies du rectosigmoïde lors d'une RS et au moins 4 biopsies de chaque segment que sont le bas œsophage, le fundus, l'antra et duodénum lors d'une EOGD, dans des pots séparés. Il faut proposer une EOGD en cas de RS non contributive et inversement en cas de forte suspicion de GVH digestive (33,38). L'alternative à l'EOGD et à la RS est une iléo-coloscopie avec biopsies étagées (4 dans chaque segment : iléon terminal, colon droit, colon transverse, colon gauche, rectosigmoïde)(37), rarement réalisable en pratique chez ces patients fragiles.

A noter qu'il est préférable de ne pas réaliser de biopsies d'ulcérations creusantes si elles sont présentes car leur interprétation est difficile en histologie du fait d'un nombre important de cellules nécrotiques peu spécifiques(38)

Il peut être utile de refaire une endoscopie en cas de GVH aiguë prouvée en échec de traitement de première ligne pour évaluer la sévérité de l'atteinte, la réponse au traitement et éliminer un diagnostic différentiel infectieux surajouté, notamment une infection à CMV (38). Une atteinte à CMV est présente chez environ un quart des patients atteints de GVH aiguë en échec de traitement chez qui on réitère une endoscopie (39).

L'endoscopie digestive avec biopsies est un examen relativement sûr avec peu de complications. Cependant, chez ces patients volontiers thrombopéniques, il a été décrit de rares cas de saignement au niveau du site biopsié ou des hématomes sous muqueux (40,41).

Selon les recommandations de l'ASGE, un taux de plaquettes  $>50\ 000/\text{mm}^3$  pour une endoscopie avec biopsies et  $> 20\ 000/\text{mm}^3$  pour une endoscopie diagnostique simple est suffisant (42). De plus, il existe un sur-risque de bactériémie lors d'examens médicaux invasifs chez les patients neutropéniques. Une antibioprophylaxie systématique est recommandée par la société européenne d'endoscopie digestive avant la réalisation d'une endoscopie digestive avec biopsies chez les patients ayant une neutropénie sévère ( $\text{PNN}<500/\text{mm}^3$ ) non fébrile (43).

## 2/ Histologie

L'analyse histologique reste un élément important du diagnostic de GVH (Tableau 4). Néanmoins, les lésions ne sont pas spécifiques et, à la phase précoce, un taux non négligeable de faux négatifs est commun.

La principale lésion histologique est l'apoptose des cellules épithéliales (Figure 2). Elle peut être le signe unique de GVH aiguë de bas grade (44). Les cellules apoptotiques sont plus facilement mises en évidence dans les aires régénératives de la muqueuse telles que les cryptes intestinales, le fond des glandes antrales ou du corps gastrique. Leur aspect peut varier, faciles à identifier lorsqu'elles contiennent des vacuoles remplies de débris cellulaires, alors appelées 'cellules en pop-corn' ou 'exploding crypt cells'(45), elles peuvent aussi se réduire à de petits corps apoptotiques. Dans les cas les plus sévères, les cryptes sont dilatées, contenant des débris cellulaires, voire détruites. Il existe généralement un infiltrat inflammatoire au niveau de la lamina propria, composé principalement de cellules mononuclées, parfois de polynucléaires éosinophiles ou neutrophiles(46). Un autre signe corrélé à un mauvais pronostic est une diminution du nombre de cellules de Paneth sur les biopsies duodénales (47).

Il faut savoir que le diagnostic de GVH aiguë sur la seule présence de cellules cryptiques apoptotiques peut être parfois difficile à distinguer des lésions induites par des diagnostics différentiels tels que la toxicité médicamenteuse digestive (48).

## 3/ Imagerie abdominale

Le scanner abdominal montre des signes très peu spécifiques et a donc une pertinence diagnostique limitée. Un scanner avec injection de produit de contraste peut mettre en évidence une dilatation de la lumière intestinale, une prise de contraste anormale et/ou un épaissement de la paroi digestive des segments atteints, des signes d'inflammation mésentérique(49). L'épaississement de la paroi intestinale dans la GVH aiguë est en général modéré, un épaissement plus important devant faire suspecter une infection concomitante ou une colite neutropénique associée (49). Une distribution discontinue des lésions est observée chez plus de 50% des patients. A noter qu'une atteinte grêlique est présente dans environ 75% des cas, ce qui peut aider à éliminer des diagnostics différentiels telle que la colite à *Clostridioides difficile* (50). Un épaissement, une prise de contraste ou une dilatation des voies biliaires sont les signes extra-intestinaux associés les plus courants (49).

L'IRM peut constituer une alternative au scanner abdominal. Les lésions mises en évidence sont similaires aux images tomodensitométriques. Le manque d'accessibilité de l'IRM en routine en fait un examen complémentaire très peu utilisé dans la prise en charge de la GVH (51).

#### **4/ Endomicroscopie confocale**

L'endomicroscopie confocale (EMC), du fait de son caractère peu invasif et de sa capacité à couvrir une surface plus importante que les biopsies, a fait l'objet d'études pour le diagnostic précoce de GVH. Les lésions de GVH digestive dans le duodénum ou le colon sont définies par la présence d'un ou plusieurs critères parmi les suivants (52) : (a) anomalie du réseau microvasculaire, (b) augmentation modérée de l'intensité de la fluorescéine dans la lamina propria, (c) villosités duodénales ou cryptes coliques déformées, (d) augmentation majeure de l'intensité de la fluorescéine dans la lamina propria, (e) modifications architecturales majeures définies par la destruction de villosités duodénales ou de cryptes au niveau du côlon.

La sévérité de la GVH peut ensuite être gradée comme suit :

- Grade minime : Un critère (a) ou (b) présent
- Grade modérée : Critère (c) ou association des critères (a) et (b)
- Grade sévère : Présence des critères (d) et/ou (e)

Une première étude (53) a d'abord montré une bonne corrélation entre les lésions visibles en EMC et les lésions histologiques chez des patients atteints de GVH digestive. Dans une autre série (54), l'EMC détectait des lésions muqueuses précoces chez des patients allogreffés non ou pauci-symptomatiques avec une bonne sensibilité. De plus, les résultats obtenus en EMC semblent davantage corrélés au score de Glücksberg modifié que l'histologie conventionnelle.

Son manque d'accessibilité n'a cependant pas fait retenir cet examen dans l'algorithme diagnostique de la GVH.

#### **5/ Vidéocapsule du grêle**

La vidéocapsule endoscopique du grêle (VCE) a montré sa capacité à détecter des lésions de GVH digestive et à en évaluer la sévérité. Il s'agit également du seul examen complémentaire disponible pour visualiser la muqueuse grêlique dans son intégralité, approche séduisante puisque la GVH aiguë digestive se caractérise par une répartition discontinue des lésions.

Les lésions de GVH aiguë digestive en VCE sont diverses et par ordre de gravité sont : des plages érythémateuses plus ou moins étendues, un œdème muqueux, des érosions muqueuses puis des ulcérations plus ou moins nombreuses, étendues, confluentes et enfin des saignements muqueux. Les critères de Brand constituent une échelle d'évaluation visuelle des lésions permettant une évaluation de la gravité de la GVH (55).

La VCE a une bonne sensibilité, comparable à celle de l'EOGD avec biopsies, et une excellente valeur prédictive négative de près de 100% pour la détection de lésions de GVH aiguë digestive (56). Une petite série a montré qu'il existe un meilleur rendement diagnostique de l'EOGD couplée à la VCE par rapport à l'endoscopie seule (56). Un autre travail a confirmé que la VCE avait un rendement diagnostique plus élevé (54%) que l'endoscopie conventionnelle (28%) chez des patients atteints de GVH digestive, en particulier sur les formes minimales à modérées où l'analyse conventionnelle endoscopique est peu sensible (57). Du fait d'une meilleure sensibilité diagnostique et d'une cartographie précise des lésions, la VCE peut également permettre une meilleure adaptation précoce des traitements immunosuppresseurs pour la prise en charge thérapeutique de la GVH digestive (58).

Cependant, la VCE manque de spécificité, en particulier sur le diagnostic d'érosions et d'ulcérations du grêle, également décrites en cas d'atteinte à Cytomégalovirus (CMV) après allogreffe. Les biopsies réalisées lors d'une EOGD restent donc indispensables à la phase diagnostique (59). Par ailleurs, l'accessibilité de la VCE est centre-dépendant.

Cet examen peut garder une place chez des patients avec des symptômes évocateurs de GVH digestive à EOGD normale (60).

Techniquement, il est suggéré dans la littérature l'utilisation de prokinétiques avant l'ingestion de la capsule endoscopique et le placement du patient en position latérale droite pendant au moins 30 min après ingestion de la capsule afin de faciliter son passage gastrique du fait de troubles fréquents de la motilité gastrique après allogreffe (61).

## **6/ Biomarqueurs**

Le biomarqueur de GVH idéal doit être peu invasif, prédire le risque de développer une GVH aiguë, diagnostiquer la maladie à un stade précoce, estimer son pronostic et prédire la réponse au traitement (62).

Les biomarqueurs présentant le plus grand intérêt pour la GVH digestive sont le ST2, Reg3 $\alpha$  et le récepteur de TNF 1 (TNFR1)(63). ST2 est libéré par les cellules T activées et constitue un récepteur pour l'interleukine 33 (63). La liaison ST2-IL33 joue un rôle important dans plusieurs pathologies inflammatoires ou auto immunes intestinales (64). Le TNFR1 est produit par les lymphocytes T et les monocytes et aggrave les lésions muqueuses intestinales au cours de la GVH (62). REG3 $\alpha$  est sécrétée majoritairement par les cellules de Paneth et joue un rôle protecteur de la muqueuse intestinale vis à vis des dommages infectieux (63).

Initialement a été établi le score de Ann Arbor (65). Il s'agit d'un système qui permet de définir des groupes de risque de mortalité sans rechute à la phase précoce de la GVH digestive en fonction des

concentrations plasmatiques des 3 biomarqueurs ST2, REG3 $\alpha$  et TNFR1. Des travaux plus récents ont permis de mettre en place l'algorithme de probabilité MAGIC (MAP). Le MAP est l'association des dosages sériques des biomarqueurs ST2 et REG3 $\alpha$  et permet de prédire la mortalité à long terme chez les patients atteints de GVH aiguë (16). Le MAP est un reflet des lésions intestinales cryptiques et lorsqu'il est mesuré au moment du diagnostic de GVH, il permet de classer les patients en 3 groupes de niveau de risque de mortalité sans rechute (66). Le MAP a été validé à partir du début des symptômes de GVH (66) mais il semble aussi plus performant que les caractéristiques pré-transplantation pour prédire la mortalité sans rechute à un stade très précoce, dans les 7 jours suivant l'allogreffe (67).

D'autres travaux sont en cours portant sur divers marqueurs de l'inflammation (CRP), marqueurs angiogéniques ou encore métabolites dérivés du microbiote (butyrate) (38).

## Diagnostiques différentiels

Devant l'apparition d'une diarrhée en post-allogreffe, il convient d'éliminer d'autres étiologies avant de conclure à une GVH aiguë digestive.

### 1/ Affections iatrogènes

Le délai d'apparition des symptômes après la greffe est un élément clé. En effet, le conditionnement pré-greffe est la cause la plus fréquente de symptômes digestifs jusqu'à 3 semaines après la greffe. Passé ce délai, la GVH digestive devient plus fréquente (24).

Parmi les autres traitements médicamenteux pouvant être en cause, le mycophénolate mofétil (MMF), un traitement antirejet, est un pourvoyeur de toxicité digestive importante, atteignant près de 50% des patients sous MMF (68). Une diarrhée aqueuse abondante est classiquement décrite 2 à 4 semaines après l'introduction du traitement (68). En endoscopie, une épargne rectale doit faire évoquer une colite au MMF(68). Les lésions histologiques sont proches de celles observées lors d'une GVH avec une apoptose des cellules coliques (69) mais peuvent s'en dissocier par la présence d'un infiltrat à éosinophiles et l'absence d'abcès cryptique (70).

### 2/ Infections

Parmi les infections virales, l'atteinte digestive à CMV doit être évoquée en premier lieu. Elle se manifeste par une diarrhée parfois sanglante, des douleurs abdominales, des symptômes digestifs hauts ou de la fièvre pouvant survenir à distance de l'allogreffe (39). Les lésions endoscopiques peuvent atteindre, comme lors d'une GVH aiguë, n'importe quel segment du tractus digestif (39). Les patients

atteints d'une infection digestive active à CMV peuvent avoir une PCR sérique CMV négative, le diagnostic de certitude se fait donc sur les biopsies digestives (24). Une étude immunohistochimique ou la réalisation d'une PCR sur les biopsies coliques peuvent être effectuées (38) car les lésions anatomopathologiques sont parfois proches de celles d'une GVH aiguë et les inclusions à CMV caractéristiques difficiles à identifier. L'infection à CMV augmente le risque de mortalité chez les patients allogreffés, il s'agit donc d'une urgence diagnostique et thérapeutique (39). Le virus de la varicelle, les adénovirus puis les astrovirus, norovirus et rotavirus sont moins fréquents dans ce contexte.

La colite à *Clostridioides difficile* est la colite bactérienne la plus fréquente après allogreffe. Son incidence est de plus de 10% et elle est associée à un sur-risque de mortalité(71). Il faut donc systématiquement la rechercher en cas de symptômes digestifs par un prélèvement de selles avec recherche de toxines. Il faut savoir que les classiques pseudo-membranes de la colite à *Clostridioides difficile* visibles en endoscopie sont souvent absentes chez les patients immunodéprimés (72).

Enfin, d'autres diagnostics différentiels comme une cryptosporidiose et une giardiose pourront être éliminés par la réalisation d'un examen parasitologique des selles et/ou des biopsies ou par l'examen anatomopathologique des biopsies.

### **3/ Colite neutropénique**

La colite neutropénique, parfois appelée typhlite du neutropénique du fait de son tropisme pour le cæcum, est une inflammation survenant chez des patients neutropéniques dans laquelle la surinfection microbienne de la muqueuse lésée joue un rôle pathogénique majeur (73).

Il s'agit d'une complication rare mais potentiellement grave du conditionnement pré-greffe et qui, contrairement à la GVH digestive, peut être observée avant la greffe.

Le diagnostic doit être évoqué chez un patient allogreffé en neutropénie fébrile présentant des douleurs abdominales et des diarrhées. Un épaissement de la paroi digestive >3mm en échographie ou en scanner viendra conforter le diagnostic. L'imagerie permettra en outre la recherche de complications (perforations digestives) et l'élimination d'un diagnostic différentiel, notamment une appendicite aiguë(74).

Même si le diagnostic de certitude est histologique, les biopsies ne sont pas recommandées du fait des risques sur ce terrain. L'œdème, la nécrose transmurale et les ulcérations sans réaction inflammatoire au contact sont les lésions caractéristiques. Elles touchent généralement le cæcum et le côlon droit et s'étendent fréquemment à l'iléon terminal (74).



La prise en charge de première intention est médicale associant mise au repos digestif, antibiothérapie intraveineuse large spectre (active sur les Clostridia et Pseudomonas) voire un antifongique. Le traitement chirurgical sera proposé en cas de complication ou d'échec du traitement médical (74).

#### **4/ Syndrome de colite après greffe du cordon**

Le syndrome de colite après greffe de cordon (SCC) est une entité clinique qui se manifeste par une diarrhée aqueuse fébrile persistante chez environ 10% des patients qui reçoivent une greffe de sang de cordon, souvent plusieurs mois après la transplantation. Il résulte d'une inflammation granulomateuse du tractus gastro-intestinal avec un aspect endoscopique d'érythème muqueux avec ou sans ulcération. Les biopsies mettent en évidence une colite chronique active, associée à de fréquents granulomes et à des cellules de Paneth métaplasiques. Le SCC est sensible aux antibiotiques mais aucun pathogène causal n'a clairement été identifié (38,75). Il s'agit d'un diagnostic d'élimination qui reste même controversé, car des études ont suggéré que les lésions de SCC étaient non spécifiques et pouvaient aussi être observées lors de GVH digestive ou colite à CMV (75).

#### **5/ Diagnostics différentiels devant des symptômes digestifs hauts.**

Ils sont principalement médicamenteux avec les effets secondaires à type de nausée du régime de conditionnement ou d'autres traitements. A noter qu'un traitement par inhibiteur de la pompe à protons peut induire une apoptose minime au niveau des cellules gastriques pouvant mimer une GVH digestive.

## **Traitements**

### **1/ Traitement prophylactique**

Le traitement prophylactique de la GVH dépend du régime de conditionnement myéloablatif ou atténué, du type de greffe et du type de donneur, apparenté ou non, de la compatibilité HLA (76). Les traitements utilisés sont, entre autres, la ciclosporine, le méthotrexate, le MMF, la cyclophosphamide et la perfusion de sérum anti lymphocytaire (76). Le cyclophosphamide en post-greffe immédiat, à fortes doses lors de greffe haplo-identique, est utilisé afin d'éliminer les lymphocytes T alloréactifs (7). Les choix des doses et des associations de traitements sont complexes, gérés par les hématologues spécialisés et ne seront donc pas détaillés ici.

Ainsi, en cas de GVH aiguë digestive déclarée, un traitement prophylactique récemment arrêté peut être repris ou, si toujours prescrit, sa dose adaptée en cas de taux sériques bas (76).

## **2/ Traitement curatif de première intention**

Le traitement de première ligne de la GVH digestive est une corticothérapie systémique, initiée à la dose de 2mg/kg/jour en 2 prises pour les GVH aiguës de grade II et plus (76) et poursuivie pendant au moins 7 jours avant d'envisager une décroissance lente pour limiter le risque de rechute. L'arrêt total de la corticothérapie ne sera discuté qu'au moment de la disparition totale des symptômes (76). La GVH est cortico-résistante en l'absence de réponse objective après 7 jours de traitement ou si on note une aggravation des symptômes après 5 jours (76). Un traitement d'attaque avec des doses plus élevées de méthylprednisolone n'a pas montré de bénéfice en terme de réponse au traitement (77). En revanche, pour les patients atteints de GVH aiguë modérée (grade II), un traitement initial à doses plus faibles (0.5 à 1mg/kg/jour) semble efficace (78).

Par ailleurs, il est intéressant d'utiliser, en association avec le traitement corticoïde classique, un corticoïde oral à action locale avec un faible passage systémique comme le budésonide ou la béclo méthasone (non disponible en France dans cette galénique). Cette stratégie a montré un bénéfice en terme d'efficacité(79) et de prévention des rechutes à la décroissance des corticoïdes systémiques (80). Pour des GVH digestives d'intensité légère à modérée (grade II), il semble même efficace et sûr d'utiliser de la béclo méthasone en monothérapie (81).

Le taux de réponse initial au traitement par corticoïdes varie selon les séries entre 40%(82) et 55%(4). Seulement un tiers de patients répondent de manière prolongée (4,82). Le taux de réponse semble dépendre de la gravité de la GVH initiale et être moindre en cas de GVH sévère, bien que certaines données ont également individualisé un sous-groupe de patients avec des symptômes digestifs de faible intensité comme moins bons réponders aux corticoïdes (4). Pour cette raison, des patients à haut risque de mauvaise réponse au traitement et de mortalité liée à la greffe ont été définis (83).

## **3/ Traitement de seconde intention**

La meilleure compréhension des différents acteurs et étapes dans la physiopathologie de la GVH permet actuellement l'émergence de nouvelles thérapies en cas d'échec des corticoïdes (84). Ils agissent sur une des 3 phases du processus de GVH en bloquant l'activation, la prolifération ou la migration des lymphocytes T du donneur ou en prévenant la destruction des cellules hôtes cibles ou encore en modulant le microbiote intestinal.

Parmi eux, citons les inhibiteurs du cycle cellulaire (sirolimus, méthotrexate, MMF...), les thérapies ciblées telles que les anti TNF $\alpha$  (infliximab, etanercept), les anti-Récepteur à l'IL6 (tocilizumab), les anti-

IL2 (inolimomab), la transplantation de microbiote fécale, la greffe de cellules souches mésenchymateuses, les anti-intégrines telles que le vedolizumab, la photophérèse extracorporelle, les inhibiteurs d'histone désacétylase (vorinostat), l'utilisation de lymphocytes T régulateurs...

#### **4/ Soins de support**

La prévention de la dénutrition est un axe essentiel de la prise en charge. En effet, une hypoalbuminémie est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de GVH digestive (85). Après une évaluation nutritionnelle individualisée, on préférera la nutrition entérale quand elle est possible. Une nutrition parentérale sera débutée chez les patients avec une diarrhée sévère ou une intolérance alimentaire totale (38).

Enfin, les différents symptômes digestifs seront traités de manière symptomatique pour soulager le patient et limiter les risques de déshydratation.

### **Conclusion**

La GVH aiguë digestive est un diagnostic qui doit être connu du gastroentérologue, sollicité le plus souvent par l'équipe d'hématologie pour réaliser une endoscopie digestive avec biopsies en vue d'une analyse en anatomopathologie, en virologie voire en parasitologie.

Les facteurs de risque sont identifiés mais il n'existe pas de marqueur prédictif idéal utilisé en routine. Or la prise en charge précoce de ces malades est un facteur clef pour permettre le contrôle et la guérison de cette complication. Le traitement de première ligne repose sur une corticothérapie fortes doses bien que de nombreuses autres possibilités thérapeutiques émergent actuellement.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors: report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://ashpublications-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2007-03-082933>
2. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016 Jan 1;22(1):4–10.
3. 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.
4. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2002 Jul 1;8(7):387–94.
5. 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005 Dec 1;11(12):945–56.
6. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
7. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Jan;13(1):10–24.
8. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966 1967;62:21–78.
9. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-Host Disease. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1550–61.
10. Acute graft-versus-host disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and management - Couriel - 2004 - *Cancer* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2019 Nov 26]. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/epdf/10.1002/cncr.20613>
11. 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.
12. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol*. 2003 Feb;4(2):154–60.
13. Cohen JL, Boyer O. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*. 2006 Oct;18(5):580–5.

14. Wysocki CA, Panoskaltzis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4191–9.
15. Peled JU, Hanash AM, Jenq RR. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Blood*. 2016 Nov 17;128(20):2395–402.
16. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018 21;131(25):2846–55.
17. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):285–94.
18. Kusakabe S, Fukushima K, Maeda T, Motooka D, Nakamura S, Fujita J, et al. Pre- and post-serial metagenomic analysis of gut microbiota as a prognostic factor in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2019 Sep 30;
19. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):903–11.
20. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):446–50.
21. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pubmed/26998764>
22. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016 18;8(339):339ra71.
23. 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.
24. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, et al. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology*. 1994 Nov;107(5):1398–407.
25. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(1):30–45.
26. Mehta RS, Cao Q, Holtan S, MacMillan M, Weisdorf DJ. Upper GI GVHD: similar outcomes to other grade II graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Aug;52(8):1180–6.
27. Schwartz JM, Wolford JL, Thornquist MD, Hockenbery DM, Murakami CS, Drennan F, et al. Severe gastrointestinal bleeding after hematopoietic cell transplantation, 1987-1997: incidence, causes, and outcome. *Am J Gastroenterol*. 2001 Feb;96(2):385–93.
28. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Jun;15(6):825–8.

29. Abraham J, Janin A, Gornet J-M, de Latour RP, Robin M, Xhaard A, et al. Clinical Severity Scores in Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease: Transplantation. 2013 Dec;1.
30. Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H, Harder J, Potthoff K, Deibert P, et al. Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Mar;47(3):430–8.
31. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, et al. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol.* 2008 Apr;103(4):982–9.
32. Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, Wu TT, Zahurak M, Vogelsang G, et al. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy.* 2002 Oct;34(10):808–13.
33. Ip S, Marquez V, Schaeffer DF, Donnellan F. Sensitivities of Biopsy Sites in the Endoscopic Evaluation of Graft-Versus-Host Disease: Retrospective Review from a Tertiary Center. *Dig Dis Sci.* 2016 Aug 1;61(8):2351–6.
34. Minamino H, Machida H, Tominaga K, Morimoto K, Ominami M, Fukunaga S, et al. Rectal biopsy, rather than ileal, is appropriate to confirm the diagnosis of early gastrointestinal graft-versus-host disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2015 Nov 2;50(11):1428–34.
35. Thompson B, Salzman D, Steinhauer J, Lazenby AJ, Wilcox CM. Prospective endoscopic evaluation for gastrointestinal graft-versus-host disease: determination of the best diagnostic approach. *Bone Marrow Transplantation.* 2006 Sep;38(5):371–6.
36. Wild D, Sung AD, Cardona D, Cirricione C, Sullivan K, Detweiler C, et al. The Diagnostic Yield of Site and Symptom-Based Biopsies for Acute Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease: A 5-Year Retrospective Review. *Dig Dis Sci.* 2016 Mar 1;61(3):806–13.
37. ASGE Standards of Practice Committee, Sharaf RN, Shergill AK, Odze RD, Krinsky ML, Fukami N, et al. Endoscopic mucosal tissue sampling. *Gastrointest Endosc.* 2013 Aug;78(2):216–24.
38. Naymagon S, Naymagon L, Wong S-Y, Ko HM, Renteria A, Levine J, et al. Acute graft-versus-host disease of the gut: considerations for the gastroenterologist. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Dec;14(12):711–26.
39. Bhutani D, Dyson G, Manasa R, Deol A, Ratanatharathorn V, Ayash L, et al. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus viremia and gastroenteritis in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):159–64.
40. Sierra A, Ecochard-Dugelay E, Bellaïche M, Tilea B, Cavé H, Viala J. Biopsy-Induced Duodenal Hematoma Is Not an Infrequent Complication Favored by Bone Marrow Transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;63(6):627–32.
41. Lipson SA, Perr HA, Koerper MA, Ostroff JW, Snyder JD, Goldstein RB. Intramural duodenal hematoma after endoscopic biopsy in leukemic patients. *Gastrointestinal Endoscopy.* 1996 Nov 1;44(5):620–3.
42. ASGE Standards of Practice Committee, Ben-Menachem T, Decker GA, Early DS, Evans J, Fanelli RD, et al. Adverse events of upper GI endoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2012 Oct;76(4):707–18.

43. Rey JR, Axon A, Budzynska A, Kruse A, Nowak A. Guidelines of the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (E.S.G.E.) antibiotic prophylaxis for gastrointestinal endoscopy. *European Society of Gastrointestinal Endoscopy. Endoscopy.* 1998 Mar;30(3):318–24.
44. Salomao M, Dorritie K, Mapara MY, Sepulveda A. Histopathology of Graft-vs-Host Disease of Gastrointestinal Tract and Liver An Update. *Am J Clin Pathol.* 2016 May 1;145(5):591–603.
45. Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, Hingorani S, Horn T, Huber E, et al. NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Apr;21(4):589–603.
46. Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2009 Jul;40(7):909–17.
47. Levine JE, Huber E, Hammer STG, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, et al. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood.* 2013 Aug 22;122(8):1505–9.
48. Lin J, Fan R, Zhao Z, Cummings OW, Chen S. Is the presence of 6 or fewer crypt apoptotic bodies sufficient for diagnosis of graft versus host disease? A decade of experience at a single institution. *Am J Surg Pathol.* 2013 Apr;37(4):539–47.
49. Brodoefel H, Bethge W, Vogel M, Fenchel M, Faul C, Wehrmann M, et al. Early and late-onset acute GvHD following hematopoietic cell transplantation: CT features of gastrointestinal involvement with clinical and pathological correlation. *European Journal of Radiology.* 2010 Mar 1;73(3):594–600.
50. Mahgerefteh SY, Sosna J, Bogot N, Shapira MY, Pappo O, Bloom AI. Radiologic imaging and intervention for gastrointestinal and hepatic complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Radiology.* 2011 Mar;258(3):660–71.
51. Budjan J, Michaely HJ, Attenberger U, Haneder S, Heidenreich D, Kreil S, et al. Assessment of acute intestinal graft versus host disease by abdominal magnetic resonance imaging at 3 Tesla. *Eur Radiol.* 2014 Aug;24(8):1835–44.
52. Wallace M, Lauwers G, Chen Y, Dekker E, Fockens P, Sharma P, et al. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy.* 2011 Oct;43(10):882–91.
53. Bojarski C, Günther U, Rieger K, Heller F, Loddenkemper C, Grünbaum M, et al. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy.* 2009 May;41(5):433–8.
54. Coron E, Laurent V, Malard F, Le Rhun M, Chevallier P, Guillaume T, et al. Early detection of acute graft-versus-host disease by wireless capsule endoscopy and probe-based confocal laser endomicroscopy: results of a pilot study. *United European Gastroenterol J.* 2014 Jun;2(3):206–15.
55. Brand RE, Tarantolo SR, Bishop MR, Pavletic ZS, Lyden ER, Quigley EMM. The correlation of endoscopic grading to clinical and pathologic staging of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. In: *Blood.* WB SAUNDERS CO INDEPENDENCE SQUARE WEST CURTIS CENTER, STE 300, PHILADELPHIA ...; 1998. p. 451A–451A.
56. Neumann S, Schoppmeyer K, Lange T, Wiedmann M, Golsong J, Tannapfel A, et al. Wireless capsule endoscopy for diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease. *Gastrointestinal Endoscopy.* 2007 Mar;65(3):403–9.

57. Pérez-Cuadrado-Robles E, Castilla-Llorente C, Quénéhervé L, López-Higueras A, Pérez-Cuadrado-Martínez E. Short article: Capsule endoscopy in graft-versus-host disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2017 Apr;29(4):423–7.
58. Impact of Small Bowel Exploration Using Video-Capsule Endoscopy in the Management of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease [Internet]. [cited 2019 Dec 3]. Available from: <https://insights-ovid-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/crossref?an=00007890-200412150-00021>
59. Kakugawa Y, Kim S-W, Takizawa K, Kikuchi T, Fujieda A, Waki F, et al. Small intestinal CMV disease detected by capsule endoscopy after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008 Aug;42(4):283–4.
60. Malard F, Mohty M. New insight for the diagnosis of gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:701013.
61. Shapira M, Adler SN, Jacob H, Resnick IB, Slavin S, Or R. New insights into the pathophysiology of gastrointestinal graft-versus-host disease using capsule endoscopy. *Haematologica*. 2005 Jul;90(7):1003–4.
62. Paczesny S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):585–94.
63. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6702–8.
64. Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mattioli B, Scarpa M, et al. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Apr 27;107(17):8017–22.
65. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, et al. A PROGNOSTIC SCORE FOR ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE BASED ON BIOMARKERS: A MULTICENTER STUDY. *Lancet Haematol*. 2015 Jan 1;2(1):e21–9.
66. Srinagesh HK, Ferrara JLM. MAGIC biomarkers of acute graft-versus-host disease: Biology and clinical application. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(4):101111.
67. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, et al. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight*. 2017 09;2(3):e89798.
68. Calmet FH, Yarur AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Ann Gastroenterol*. 2015 Sep;28(3):366–73.
69. Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg A, Khaled A, Nogueira J, Wiland A, et al. Histologic features of mycophenolate mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. *Int J Surg Pathol*. 2003 Oct;11(4):295–302.
70. Star KV, Ho VT, Wang HH, Odze RD. Histologic features in colon biopsies can discriminate mycophenolate from GVHD-induced colitis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Sep;37(9):1319–28.
71. Trifilio SM, Pi J, Mehta J. Changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease during stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Mar;19(3):405–9.



72. Nomura K, Fujimoto Y, Yamashita M, Morimoto Y, Ohshiro M, Sato K, et al. Absence of pseudomembranes in *Clostridium difficile*-associated diarrhea in patients using immunosuppression agents. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(1):74–8.
73. Machado NO. Neutropenic enterocolitis: A continuing medical and surgical challenge. *N Am J Med Sci*. 2010 Jul;2(7):293–300.
74. Perrin C, Vanjak D, Servois V, Galéano C, Mariani P, Tzanis D, et al. La colite neutropénique : synthèse des données disponibles. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 2019 Sep 1;26(7):665–71.
75. Shimoji S, Kato K, Eriguchi Y, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, et al. Evaluating the association between histological manifestations of cord colitis syndrome with GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Sep;48(9):1249–52.
76. Ruutu T, Gratwohl A, Witte T de, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT–ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Feb;49(2):168–73.
77. Van Lint MT, Uderzo C, Locasciulli A, Majolino I, Scimé R, Locatelli F, et al. Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2288–93.
78. Mielcarek M, Furlong T, Storer BE, Green ML, McDonald GB, Carpenter PA, et al. Effectiveness and safety of lower dose prednisone for initial treatment of acute graft-versus-host disease: a randomized controlled trial. *Haematologica*. 2015 Jun;100(6):842–8.
79. McDonald GB, Bouvier M, Hockenbery DM, Stern JM, Gooley T, Farrand A, et al. Oral beclomethasone dipropionate for treatment of intestinal graft-versus-host disease: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):28–35.
80. Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, Gooley T, Schuening F, Rowley S, et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4557–63.
81. Castilla C, Pérez-Simón JA, Sanchez-Guijo FM, Díez-Campelo M, Ocio E, Pérez-Persona E, et al. Oral beclomethasone dipropionate for the treatment of gastrointestinal acute graft-versus-host disease (GVHD). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Sep;12(9):936–41.
82. Weisdorf D, Haake R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, et al. Treatment of moderate/severe acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*. 1990 Feb 15;75(4):1024–30.
83. MacMillan ML, DeFor TE, Weisdorf DJ. What predicts high risk acute graft-versus-host disease (GVHD) at onset?: identification of those at highest risk by a novel acute GVHD risk score. *Br J Haematol*. 2012 Jun;157(6):732–41.
84. Renteria AS, Levine JE, Ferrara JLM. Therapeutic targets and emerging treatment options in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016;4(5):469–84.
85. Ayuk F, Bussmann L, Zabelina T, Veit R, Alchalby H, Wolschke C, et al. Serum albumin level predicts survival of patients with gastrointestinal acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2014 May;93(5):855–61.

86. Lee C, Haneuse S, Wang H-L, Rose S, Spellman SR, Verneris M, et al. Prediction of absolute risk of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation. PLOS ONE. 2018 Jan 18;13(1):e0190610.
87. Advances in predicting acute GVHD - Harris - 2013 - British Journal of Haematology - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1111/bjh.12142>

## Tableaux

**Tableau 1 : Facteurs de risque de GVH**

*D'après (3,6,86,87)*

<b>Facteurs de risque</b>	<b>Facteurs protecteurs</b>
* <b>Donneur non apparenté (donneur de ficher)</b>	* Régime de conditionnement atténué
* <b>Incompatibilité HLA</b>	* Traitement par du sérum anti-lymphocytaire
* Mésappariement sur le sexe (donneur féminin/receveur masculin)	
* Altération de l'état général : Karnofsky <90%	
* Stade évolué de la maladie hématologique	
* Leucémie myéloïde chronique	
* Greffe à partir de cellules souches sanguines circulantes plutôt que de moelle osseuse	
* Irradiation corporelle totale	
* Injection de lymphocytes du donneur	
* Monothérapie prophylactique en post greffe	

**Tableau 2 : Score modifié de Glücksberg.**

Stade	PEAU	SYSTÈME DIGESTIF	FOIE
0	Pas d'éruption cutanée	Asymptomatique	Bilirubinémie < 2mg/dL
I	Eruption maculo-papuleuse <25% de la surface corporelle sans signe associé	Diarrhée > 500-1000ml par jour ; nausées/vomissements	Bilirubinémie entre 2 et 6mg/dL
II	Eruption maculo-papuleuse ou érythème prurigineux ou autres symptômes associés ≥ 25 % ou < 50% de la surface corporelle ou desquamation localisée	Diarrhées 1000-1500mL par jour ; nausées/vomissements	Bilirubinémie entre 3 et 6mg/dL
III	Erythrodermie généralisée ou éruption vésiculaire, maculaire ou papulaire symptomatique avec bulles ou desquamation ≥ 50% de la surface corporelle	Diarrhée >1500ml par jour ; nausées/vomissements	Bilirubinémie entre 6 et 15mg/dL
IV	Dermatite exfoliative généralisée ou dermatite ulcéreuse et/ou bulleuse	Douleurs abdominales sévères et/ou iléus	Bilirubinémie ≥ 15mg/dL

**SCORE GLOBAL**

- GRADE 0 : Aucune atteinte d'organe
- GRADE I : Atteinte cutanée grade I-II sans atteinte digestive ou hépatique
- GRADE II : Atteinte cutanée grade III et/ou atteinte digestive et/ou hépatique de grade I
- GRADE III : Atteinte cutanée grade 0 à III et atteinte digestive ou hépatique de grade II-III
- GRADE IV : Atteinte cutanée, digestive ou hépatique de grade IV

**Tableau 3 : Classification de Freiburg des lésions endoscopiques de GVH digestive**

<b>GRADE I</b>	Muqueuse normale ou subnormale
<b>GRADE II</b>	Plages d'érythème ou minimales lésions aphtoïdes
<b>GRADE III</b>	Ulcérations aphtoïdes (Crohn-like), érosions focales
<b>GRADE IV</b>	Ulcérations profondes, mise à nue de la musculature

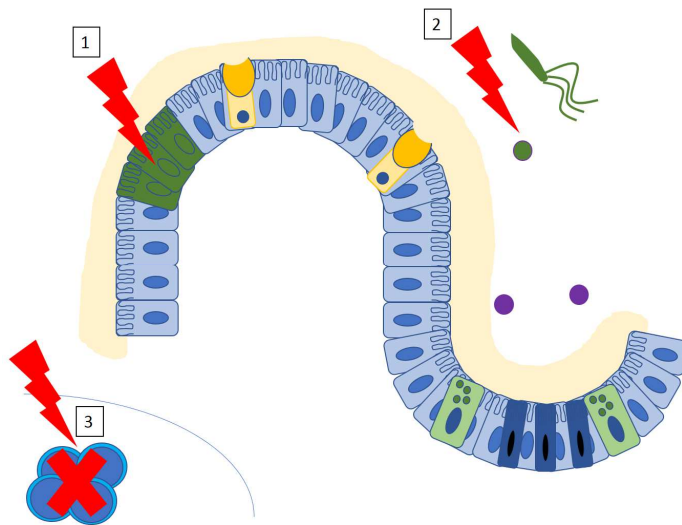
**Tableau 4 : Diagnostic histologique de GVH digestive**

<b>Signes histologiques</b>	
Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aucune</li> <li>● Isolée</li> <li>● Plusieurs par crypte</li> </ul>
Destruction des cryptes	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Aucune</li> <li>● Isolée (une crypte)</li> <li>● Extensive (plusieurs cryptes consécutives)</li> </ul>
Inflammation	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Absente</li> <li>● Présente dans la lamina propria au niveau de 6 cryptes (cellules mononuclées, polynucléaires éosinophiles ou neutrophiles)</li> </ul>
Abcès cryptiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Absent</li> <li>● Présent</li> </ul>
Autres	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Inclusions virales, microorganismes, pseudomembranes</li> </ul>
<b>Diagnostic final</b>	
Pas de GVH	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Pas de signe de GVH identifié</li> </ul>
Possible GVH	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Présence de signes de GVH mais diagnostic différentiel possible : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Présence d'agents infectieux (CMV, cryptosporidiose)</li> <li>○ Suspicion clinique de colite médicamenteuse (IPP, régime de conditionnement, MMF)</li> </ul> </li> </ul>
Probable GVH	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Signes univoques de GVH sans facteur confondant ou</li> <li>● Signes clairs de GVH avec facteurs limitants tels que matériel biopsique limité, facteurs confondants à distance des zones apoptotiques, cellules apoptotiques rares sans autre étiologie, chimiothérapie ou radiothérapie récente ou</li> <li>● GVH très probable mais manque d'information clinique ou</li> <li>● GVH validée sur des spécimens biopsiques consécutifs ou</li> <li>● Pas de diagnostic différentiel</li> </ul>

CMV : Cytomégalovirus ; IPP : Inhibiteur de la pompe à protons ; MMF : Mycophénolate mofétil

*D'après (44)*

## Figures



**Figure 1 : Physiopathologie de la GVH aiguë**

Figure 1A : Effets du conditionnement pré greffe sur la barrière intestinale. La chimiothérapie a un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales intestinales qui libèrent des antigènes tissulaires (1). Le microbiote intestinal est modifié par les antibiothérapies éventuelles, les modifications de régime et la pathologie hématologique sous-jacente (2). Ces modifications ont pour effet d'augmenter la perméabilité intestinale. La chimiothérapie éventuellement associée à une radiothérapie a un effet ablatif sur les lymphocytes du receveur (3).

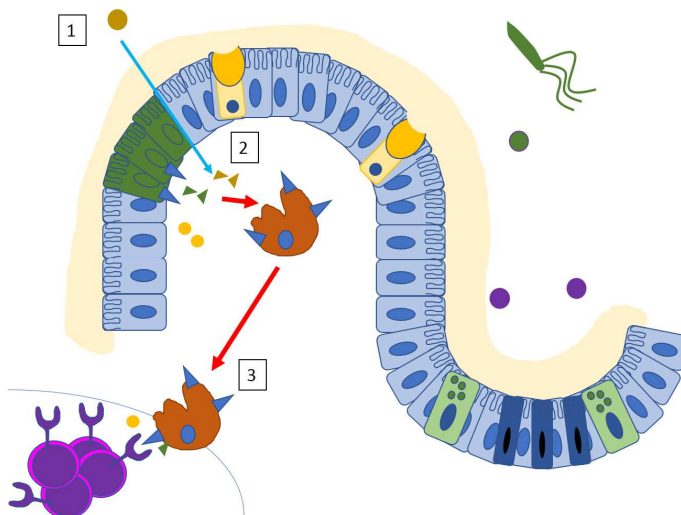


Figure 1B : Activation des CPA. L'augmentation de la perméabilité intestinale se traduit notamment par un passage accru des antigènes bactériens (1). L'importante réaction inflammatoire générée par la libération d'antigènes tissulaires, de cytokines régulant la migration des cellules immunitaires (chimiokines) et de cytokines pro-inflammatoires, va entraîner une expression accrue des molécules d'adhésion et des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité des CPA, puis entraîner leur activation (2). Ces CPA migrent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires où elles rencontrent les lymphocytes du donneur (3).

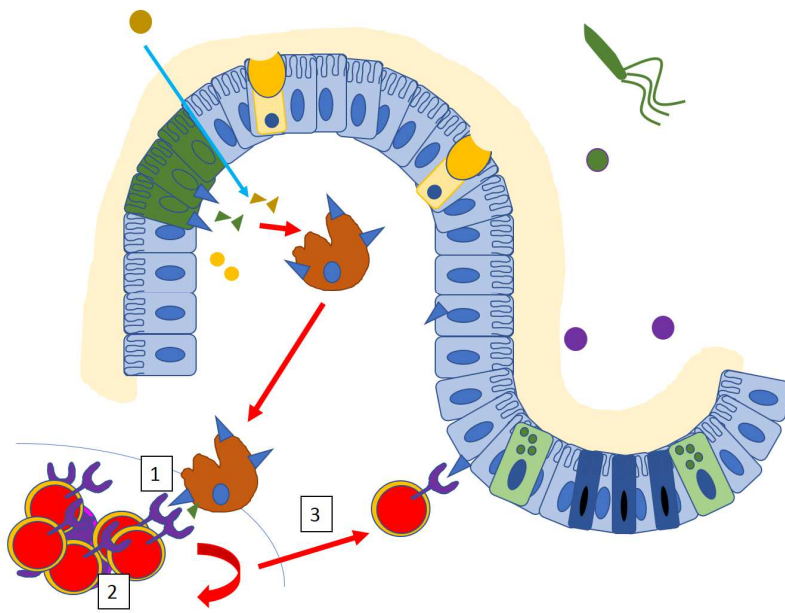


Figure 1C : Activation, différenciation, prolifération et migration des lymphocytes T. Les lymphocytes T du donneur sont activés par les CPA en présence de molécules de co-stimulation (1). Ils se différencient et prolifèrent (2) avant de migrer dans la muqueuse intestinale (3).

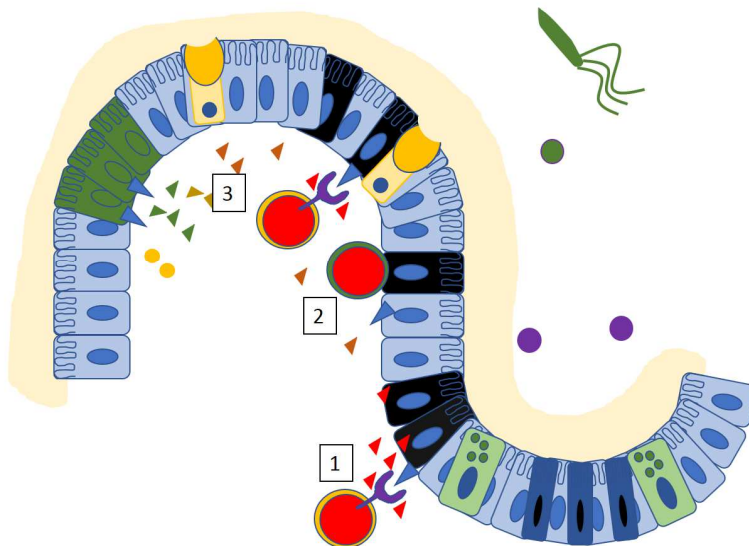
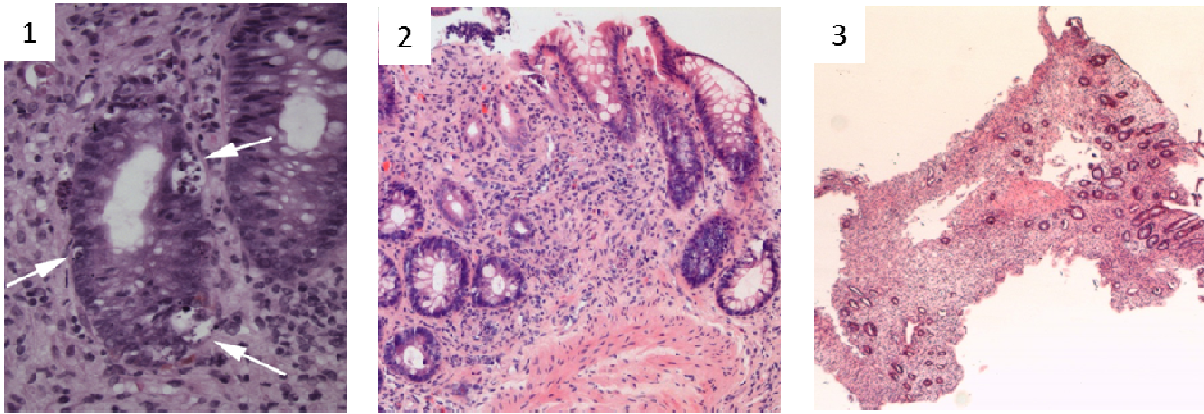


Figure 1D : Destruction du tissu cible. Les effecteurs tissulaires sont principalement les lymphocytes T cytotoxiques (1) et les NK (2). De nombreuses cytokines pro inflammatoires sont sécrétées dont le  $TNF\alpha$  qui joue un rôle majeur dans l'amplification et la propagation de la « tempête cytokinique » (3).



*Pr BOSSARD C., Service d'anatomopathologie, CHU de Nantes*

## Figure 2 : Aspects anatomopathologiques

**Lésions élémentaires** : Apoptose des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale (flèches blanches) et infiltrat focal mononucléé +/- polynucléé du chorion.

**Score de sévérité morphologique** de la GVH (*selon Sale et al, 1979 et Epstein et al, 1980*) : Grade I (1) : corps de nécrose apoptotique isolé ; Grade II (2) : destruction de moins de 3 cryptes contigües ; Grade III : destruction de plus de 4 cryptes contigües ou plus ; Grade IV (3) : destruction étendue avec dénudation de la muqueuse



## **Partie 2 : Etude Clinique**

Early remodeling of the colonic mucosa after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation: a prospective study on 19 patients

## Abbreviations

GVHD: graft-versus-host disease

aGVHD: acute graft-versus-host disease

Allo-HSCT: allogeneic hematopoietic stem cells transplantation

DAMPs: damage-associated molecular patterns

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

ISC: intestinal stem cells

ST2: the suppressor of tumorigenesis 2

REG3 $\alpha$ : soluble receptor for the IL-33 and regenerating islet-derived 3-alpha

pCLE: probe-based confocal laser endomicroscopy

CMV: cytomegalovirus

IBD: inflammatory bowel disease

MAP: MAGIC algorithm probability

## Introduction

The main complication of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) is graft-versus-host disease (GVHD), an immunological disorder that affects several organ systems, including the gastrointestinal tract (1). It is a potentially severe condition, as acute GVHD (aGVHD) remains the second leading cause of death following allo-HSCT (2). The diagnosis of aGVHD is based on the analysis of clinical manifestations including specific lesions of the skin, liver and gastrointestinal tract and laboratory criteria in the appropriate clinical context after exclusion of other causes. Manifestations of chronic GVHD are diverse, mimic those observed in autoimmune pathologies and can affect one or more organs or tissues (3).

Currently, risk factors before transplantation that are associated with an increased relative risk of GVHD are well known (4–6). Classically, the most important are an unrelated donor, an HLA mismatching (4), a female donor for a male recipient, a Karnofsky score less than 90% (7), an advanced stage of hematological disease (4,7), the use of mobilized blood hematopoietic stem cells for graft instead of bone marrow, treatment by total body irradiation, a myeloablative conditioning regimen, treatment with donor lymphocyte infusion, a monotherapy prophylaxis treatment of GVHD, lack of treatment with in-vivo T-cell depletion (4–7). All these elements are now properly considered before deciding an allo-HSCT. Classically, 3 phases are described in the initiation of aGVHD : first, activation of recipient antigen-presenting cells, second, activation, differentiation, proliferation and migration of donor T lymphocytes, and third, destruction of the tissue by cellular and humoral actors. Mechanisms at stake with pathophysiology of aGVHD and the role of the digestive mucosa are now better understood. During the first phase, the intestinal barrier lesions play a role in the activation of recipient antigen-presenting cells (8). Indeed, intestinal epithelium cells and tight junctions are altered by the conditioning regimen, leading to an increase in intestinal permeability. As a consequence, the systemic passage of microbial antigens such as lipopolysaccharides through the lamina propria is increased, leading in turn to antigen-presenting cells activation. In addition, different intestinal cell types, such as goblet cells, whose most important role is to produce mucus, and Paneth cells, which produce stem cells growth factors and a

large number of antimicrobial molecules, are altered by the conditioning and are reduced in aGVHD murine models (8). Plus, cell damages related to conditioning lead to a release of damage- and pathogen-associated molecular patterns (DAMPs and PAMPs) which also activate cells of the innate immune system. Moreover, the intestinal stem cells (ISC) located at the base of the intestinal crypts and able to generate all cell types of the intestinal epithelium are also damaged in allo-HSCT murine models and seem to play an important role in the pathophysiology of aGVHD (8). During the second phase, the digestive mucosa is one of the site of lymphocytes activation and migration. Indeed, antigen-presenting cells and T lymphocytes encounter in the gut-associated lymphoid tissue. Plus, pro-inflammatory cytokines play an important role in the recruitment of donor T cells to the digestive tract (9). For instance, members of the IL-1 cytokine family like IL33 and IL1 $\beta$ , increase tissue damages promoting acute inflammatory processes initiated by the cells of the innate immune system and T cells differentiation (9). STAT3-dependent cytokines (IL6-IL23-IL21) also play a prominent role in the induction of inflammation within aGVHD target tissues. TNF- $\alpha$  has diverse major roles in the pathogenesis of aGVHD, on one hand indirectly by promoting the differentiation and proliferation of donor T cells and on the other hand directly by leading to apoptosis on aGVHD target tissues during the third phase of tissue destruction (10). This last phase is further promoted by DAMPs and PAMPs, which participate in direct tissue damages and contribute to cytokine storm of aGVHD (9).

An early diagnosis of aGVHD is key to initiate and optimize immunosuppressive treatments. For example, thanks to an algorithm using two plasma biomarkers (the suppressor of tumorigenesis 2 (ST2) and regenerating islet-derived protein 3-alpha (REG3 $\alpha$ )), it is now possible to define patients at risk of severe digestive aGVHD and to define the risk of non-relapse mortality after allo-HSCT (11–13). However, no blood or morphological examination can currently predict the occurrence of aGVHD after allo-HSCT.

While severe digestive aGVHD is likely the most severe form of aGVHD, gastrointestinal symptoms are rather common in allo-HSCT patients, but not specific of digestive aGVHD. Indeed, usual symptoms of digestive aGVHD are watery or bloody diarrhea, abdominal pain, nausea or vomiting (3). Therefore, endoscopic examination with biopsy sampling of the mucosa remains useful to confirm the diagnosis and exclude differential diagnoses (14). The most common endoscopic lesions such as erythema, aphthous

lesions, erosions, ulcerations or denudation of the mucosa are non-specific (15). Endoscopy may also be normal (15). The histopathologic hallmark of digestive aGVHD is epithelial cell apoptosis (14,16). A sparse inflammatory infiltrate of the lamina propria (14) and a loss of Paneth cells, particularly in the duodenal mucosa (17), can also be observed. However, since lesions can occur along the whole digestive tract, there is a risk of sampling error, and endoscopic and histological involvements are not well correlated (15,18). In addition, the histological diagnosis, especially in the early phase, can be difficult due to a significant number of false negatives (16). Moreover, epithelial cells apoptosis in digestive biopsies can be highlighted in other situations like infection or drug toxicities (19). Finally, due to frequent thrombocytopenia in these patients, performing biopsies during a routine endoscopy can be at risk of digestive bleeding and intramural hematoma (20,21). In this context, early diagnosis of digestive aGVHD remains an issue.

Novel imaging modalities have been developed to offer extensive and non-invasive exploration of the gastrointestinal tract as well as alternatives to conventional histology during endoscopic procedures. Probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) is a high-resolution imaging modality allowing access to *in vivo* histology at the subcellular level during ongoing endoscopy (22). A single small pilot study assessed confocal laser endomicroscopy performances in digestive aGVHD patients and showed that pCLE had good sensitivity and specificity compared to conventional histology (23). Another study suggested that the pCLE, coupled with another non-invasive test such as wireless capsule endoscopy, could predict early onset of GVHD in allo-HSCT patients (22).

The primary aim of our study was to determine if the pCLE parameters could predict GVHD onset in a prospective cohort of allo-HSCT patients. The secondary aims were to determine if an early remodeling of the colonic mucosa occurred after allo-HSCT and if there was any difference in paracellular permeability and tissue cytokine profiles between patients who declared GVHD and patients who didn't.

## Methods

### Study design and patients.

This prospective single-centre study resulted from a collaboration between the Gastroenterology Department and the Hematology unit of the University Hospital of Nantes. Consecutive adult patients, who underwent allo-HSCT from June 2016 to August 2018 for hematologic malignancies in remission were included. All patients had received a reduced-intensity conditioning regimen. Exclusion criteria were myeloablative conditioning regimen, history of previous allo-HSCT, development of clinical GVHD before initial rectosigmoidoscopy, treatment by corticosteroids >0.5mg/kg/jour, thrombocytopenia <70g/L or TP <50% the day of rectosigmoidoscopy, uncontrolled medical conditions, prior history of allergy to fluorescein, renal dysfunction, suspected or documented bowel obstruction, known inflammatory bowel disease and a history of major abdominal surgery. All patients were enrolled in a clinical research protocol approved by the local ethical committee (IRB number NCT02707354; RC 15\_0327) and written informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Subjects who underwent a colonoscopy for screening or surveillance of polyps/cancer and had a pCLE examination performed for research purpose, after written informed consent (BRD 08/6-A), served as a control group in the pCLE part of our study. Their pCLE data had been used in a previous study (24). Subjects who underwent a colectomy for colonic cancer and had normal tissue samples taken from the colectomy specimen for immunological experiments in the Inserm unit 1024 (DC-2014-2206) served as a control group in the immunological part of our study.

### Study protocol

Patients were screened in the Hematology unit when allo-HSCT was scheduled. They were included the day of the first visit in the absence of exclusion criteria. Information about the study was given during a medical consultation.

A rectosigmoidoscopy with standard biopsies and pCLE was performed during the first visit, between day 21 and day 28 after the allo-HSCT. Patients were subsequently followed until day 100. Clinical symptoms, laboratory values and medications were recorded in the eCRF. The GVHD score was established according to the modified Glücksberg grading system at the first visit and either at the GVHD diagnosis or at day 100, for patients who did not had GVHD. Medical records were then retrospectively reviewed for acute or chronic GVHD with a median follow-up of 21 months (3-35). During the follow up, a standard of care rectosigmoidoscopy was performed in case of clinical suspicion of digestive aGVHD.

### **Diagnostic of GVHD**

Depending on the time of onset after allo-HSCT and clinical characteristics, a distinction was made between (3): (a) classic aGVHD, defined by any clinical signs of aGVHD occurring within 100 days after allo-HSCT, (b) persistent or recurrent aGVHD, defined by the onset of aGVHD without any chronic GVHD sign occurring beyond 100 days, conventionally when immunosuppressive therapies were stopped, (c) classic chronic GVHD, defined by any typical signs of chronic GVHD without notion of time of onset after allo-HSCT.

According to Glücksberg classification, aGVHD was clinically graded and staged in severity from grades I to IV depending on the extent of skin, liver and gastrointestinal tract involvement (25).

Diagnostic of digestive aGVHD was made according to pathological criteria. Stool culture and searching for *Clostridioides difficile* toxin in stool and for Cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma were systematically performed in order to exclude other differential diagnoses. Cutaneous and ocular GVHDs were diagnosed at clinical examination without pathological confirmation. Cutaneous GVHD was defined by a maculopapular skin rash and ocular GVHD by xerophthalmia or conjunctivitis.

GVHD group refers to patients, who have declared a GVHD, all locations combined, during the follow-up. No GVHD group refers to patients, who did not declare a GVHD during the follow-up.

## **Rectosigmoidoscopy and pCLE procedures**

Rectosigmoidoscopy was performed by a single endoscopist, in non-sedated patients, after distal colon cleansing with enema, using a standard colonoscope (EC530, Fujinon). First, examination of colonic mucosa was carried out up to 35cm from the anal margin. Then, 6 standard biopsies were collected for conventional routine histology and laboratory analysis.

pCLE recording was performed using a dedicated CLE system composed of a portable laser station (Cellvizio; Mauna Kea Technologies, Paris, France) and an endoscopic probe (Coloflex; Mauna Kea Technologies). The endoscopy nurse injected intravenously 5 mL of a 10% fluorescein sodium solution, as a contrast agent to visualize crypts and vessels architecture. Then the probe was threaded through the operating channel of the endoscope and positioned onto the colonic mucosa under endoscopic guidance for the record to start within 10 minutes after the fluorescein injection as previously published (22). With the distal end of the pCLE probe resting gently on the tissue, it produced images of the digestive mucosa at a subcellular level (22,24). The choice of colonic areas imaged by CLE was left to the endoscopist's discretion, as the mucosa had a normal aspect in all patients.

## **Analysis of pCLE parameters**

A semi-automated and reproducible method of reading confocal endomicroscopy films was developed by our group (24) and was used in our study. To analyse a large mucosal surface, recordings were first investigated with the Cellvizio Viewer software (Mauna Kea Technologies) to perform mosaicking which consisted of stitching consecutive frames to "rebuild" the surface imaged by the probe. Each mosaic was then processed to measure 12 parameters, that were used to perform a quantitative analysis of the mucosa, hereafter referred to as "cryptometry"(24).

First, in order to determine if the size and shape of the crypts were altered, **architectural parameters of the crypts** were calculated using Icy software (Institut Pasteur, Paris, France) (26). To perform the calculation, we used the active cells plug-in that implements an active contour segmentation



method, which computes a region of interest. The perimeter, the sphericity (defined by  $4 \times \pi \times \text{Area} / \text{Perimeter}^2$ ), the roundness (defined by the normalized ratio between radii of the minimum and maximum circles inside the crypt shape), the maximal Feret diameter (defined by the maximal distance between 2 points of the perimeter), the elongation factor (defined by the ratio between the minor diameter and the major diameter) and the Ma/ma ratio (defined by the ratio between the width and the height of the box containing the crypt) were obtained.

Second, in order to determine if the **crypt density and distribution** were modified, we used a macro in ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md) (27) to calculate the ratio between the field of view area and the sum of the areas of the crypt. The measurements of the minimal and mean intercrypt distances (distance between the geometrical centers of neighboring crypts) and wall thickness (distance between nearest neighbor crypts) have been adapted from a plug-in (24).

Third, in order to determine if the microvasculature around the crypts was altered, the **vessel parameters** were measured using the IC Viewer (Mauna Kea Technologies) version 3.8.6 Vessel Detection plug-in. This plug-in enabled an automatic detection of the vessels directly from each endomicroscopic recording frame. We reported the vessel areas to the field of view area to normalize the data. The mean vessel area and mean vessel diameter were measured (Figure 1).

### **Measurement of paracellular permeability**

Three standard biopsies were mounted in Ussing chambers (World Précision Instruments; WPI), exposing an area of 0.011cm<sup>2</sup>. The tissues were bathed on each side with 2mL of Ham's nourishment mix (FAM's F12; Life Technologies). The environment was continuously oxygenated and maintained at 37°C by a gas flow (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>). After a period of 30 minutes, 200 µl of apical medium were replaced by a mixture of 200 µl of fluorescein- 5.6 sulfonic acid (400 Da) (1mg/mL Life Technologies). The fluorescence level of the basolateral aliquots of 150 µl was measured every 30 minutes for 180 minutes using a fluorimeter (Varioskan®, Thermo Fisher Scientific). Paracellular permeability was

determined by averaging the gradient of change in fluorescence intensity over time in the three biopsies that were analyzed per patient, using a linear regression fit model.

### **Assay of tissue cytokines**

Explants of colonic biopsies from allo-HSCT patients and colonic mucosa from controls were cultured for cytokines measurements. Three endoscopic biopsies per patients were collected for that purpose. Methods have been described elsewhere (28). Briefly, specimens of full-thickness normal colon were sampled 10-cm from a colonic tumor site. Immediately after removal, the tissues were placed in 4°C oxygenated Krebs solution, and the mucosa was carefully stripped from the underlying compartment made of muscularis mucosae and submucosa. Both fragments of colonic explants and of endoscopic biopsies were cut out and pinned in Sylgard-coated Petri dishes and maintained in culture for 24 in 2 ml Ham F12/RPMI medium (Invitrogen) containing 0.01% BSA and antibiotics (200 µg/ml streptomycin, 200 U/ml penicillin, 1% fungizone; Invitrogen). The explants were maintained at 37°C in a 95% oxygen, 5% carbon dioxide humid atmosphere on a rocking platform at low speed. Mucosa explant cultures were performed. At the end of the 24h-cultures, the supernatants were centrifuged, and aliquots were stored at –80°C for further analysis. Dosage of pro-inflammatory cytokines (IL1β, IFN γ, TNF α, IL33, IL6, IL17A, IL15, IL18) were made in the supernatant of biopsy cultures for each allo-HSCT patient and in the supernatant of colonic cancer explant cultures for control patients. The analyses were performed with ELISA multiplex technique. The dosages are expressed in pg/mL. The aim of these measures was to determine changes in inflammatory pattern in allo-HSCT patients.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, USA). Quantitative data were described using non parametric tests (Mann Whitney test and ANOVA). Qualitative data were described using Chi-square test. A value of p inferior to 0.05 was considered as significant.

## Results

### Patients

Between June 2016 and August 2018, 19 patients who underwent allo-HSCT were included in our study. There was a majority of male (63%) and the mean age was 61.3 years old (38-69). Ten (53%) patients were treated for an acute leukemia, 7 (37%) for a non-Hodgkin leukemia and 2 (10%) for an aplastic anemia. The conditioning regimen was based on fludarabin for 13 (68%) patients and on clofarabin for 6 (32%). All patients received a peripheral blood stem cells graft. Concerning GVHD prophylaxis, 7 (37%) patients were treated by only ciclosporin and 12 (63%) were treated by ciclosporin and mycophenolate-mofetil. Regarding HLA matching, 10 (53%) of patients received a graft from a matched related donor and 9 (47%) from a matched unrelated donor. Fifteen (79%) of allo-HSCT were CMV-compatible and only 9 (47%) were sex-compatible.

Patients and allo-HSCT characteristics are summarized in Table 1. There was no significant difference between no GVHD and GVHD groups.

Respectively 7 and 5 subjects served as controls for the pCLE and the cytokine analysis (Figure 2).

### GVHD characteristics

A digestive GVHD occurred in 6 patients (32%), among which 3 classic aGVHDs (16%) et 3 recurrent aGVHDs (16%). During the follow-up, one patient (5%) had an oral mucosa GVHD and 2 patients (10%) an ocular GVHD, which are chronic manifestations of GVHD. A cutaneous GVHD occurred in 6 patients (32%) (4 acute and 2 chronic). In 4 patients, there was an overlap between different types of GVHDs, ie. cutaneous GVHDs associated with digestive (2 patients) and ocular (2 patients) GVHDs. Total, 11 patients (58%) declared a GVHD all locations combined during the follow-up (Figure 2). Among aGVHDs, 2 were classified grade I (isolated cutaneous symptoms), 4 were classified grade II or III (digestive +/- skin involvement) and 2 digestive GVHDs were classified as severe, grade IV. The

mean time from allo-HSCT to aGVHD onset and to any GVHD onset were 82 days (25-155) and 100 days (25-160) respectively.

### **Rectosigmoidoscopy and pCLE**

Rectosigmoidoscopy was performed in all patients. Good quality pCLE images were obtained in the totality of examinations. The mean number of crypts analyzed for each patient was 55 (16-127). There was no side effect of rectosigmoidoscopy nor pCLE.

### **Crypt architecture, density, distribution and vessels in pCLE**

Within the allo-HSCT group, there was no significant difference between patients who had GVHD and those who did not have a GVHD during the follow-up for any of the cryptometry parameters (Figures 3, 4, 5). However, the median perimeter of crypts was increased in allo-HSCT patients ( $676 \pm 176 \mu\text{m}$ ) compared with controls ( $483 \pm 50 \mu\text{m}$ ) ( $p = 0.001$ ). The crypts median sphericity was decreased in the allo-HSCT group ( $41 \pm 10\%$ ) compared to the control group ( $62 \pm 9\%$ ) ( $p = 0.0001$ ) and the median roundness was also decreased in the allo-HSCT group ( $47 \pm 15\%$ ) compared to the control group ( $60 \pm 5\%$ ) ( $p=0.02$ ) (Figure 3). Concerning the other parameters, there was no significant difference between control and allo-HSCT groups (Figures 4 and 5).

No cryptometry parameter was associated with the time of GVHD onset.

### **Paracellular permeability**

There was no significant difference between GVHD and no GVHD groups (mean  $0.17 \pm 0.01$  vs  $0.22 \pm 0.1$ ,  $p=0.40$ ) (Figure 6). We performed intermediate analysis according to the digestive symptoms, the conditioning regimen, the initial hematological disease and no parameter seems to have a significant influence on paracellular permeability.

## **Pro-inflammatory cytokines in explant culture**

Concerning the explant culture cytokines, IL6, IL33, IL18, IL15 rates were significantly increased in the allo-HSCT group compared to the control group.. IL1 $\beta$  was significantly increased in the control group compared to the allo-HSCT group, result which may seem discordant. Concerning IL17A, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  rates, there was no significant difference between controls and allo-HSCT patients.

There was no significant difference between GVHD and no GVHD groups for any cytokines (Figure 7).

## **Discussion**

In this prospective cohort of allo-HSCT patients, there was no statistical difference in pCLE parameters between patients who had GVHD during follow-up and patients who didn't. Indeed, perimeter of the crypts seemed to be larger and crypt sphericity seemed to be decreased in the GVHD group, without reaching significance. Therefore, this study failed to identify predicting factors of GVHD onset.

A first explanation is that the pCLE analysis was made prior to onset of GVHD symptoms, which can suggest that intestinal barrier changes induced by GVHD were not yet present. In the last decade, many studies have attempted to find tools for early diagnosis and evaluation of the severity of GVHD in order to more appropriately tailor immunosuppression in a fragile patient's population. In this context, the MAGIC algorithm probability (MAP) was developed (13). The MAP uses the combination of the serum concentrations of two biomarkers, ST2 and REG3 $\alpha$ , that predict long-term mortality in aGVHD (29). The MAP reflects intestinal crypt damage in aGVHD (29). When measured at aGVHD diagnosis, the MAP separates patients into 3 distinct groups according to the different levels of risk of non-relapse mortality (29). This two biomarkers-model was validated using serum samples at the time of aGVHD onset (13), but the MAP also predicts non-relapse mortality better than pre-transplant characteristics prior to the onset of aGVHD symptoms at 7 days following HSCT (12). This last data suggests that alterations of the intestinal barrier are indeed an early event in GVHD onset.

Otherwise, the mean onset of aGVHD in this study was 82 days, data consistent with a recent study which showed that the median time to diagnosis in 169 patients with digestive aGVHD after allo-HSCT was 84 days (30). This supports the hypothesis of an analysis performed too early. Another explanation to the absence of difference between the 2 groups could have been that GVHDs were not severe in our study and that only subtle changes to the mucosa were present. Only mild or moderate GVHDs could have explained less significant cryptometric damage. However, our population was similar to the literature data (31), with 60% of patients declaring a GVHD and 32% a digestive aGVHD. Among the patients with a digestive aGVHD, a third had a severe GVHD (grade IV). Nevertheless, the low number of patients and the low absolute number of GVHDs in the cohort studied is an important limitation of the study and this lack of power could explain the absence of a significant difference between the no GVHD group and GVHD group.

In addition, the cryptometric analysis protocol used in this study was designed by our group initially for the study of mucosal anomalies of chronic inflammatory bowel disease (IBD) (24). A previous study demonstrated that pCLE images could differentiate normal endoscopic mucosa between healthy control subjects and patients with IBD in remission by highlighting changes in the pCLE morphology of the crypts, vessels, and fluorescence into colonic mucosa (24). In our study, this semi-automated analysis was performed for the first time in the GVHD context. As a consequence, the choice of cryptometric parameters being made in IBD setting, one could argue that these parameters were not adequate for GVHD mucosal context. However, similarities between IBD and GVHD concerning intestinal barrier dysfunction and gut microbiota modification have been reported. Indeed, intestinal epithelial damages and lesions of tight junctions increasing intestinal permeability, the high rate of TNF $\alpha$  in tissue and serum in case of severe diseases and the loss of microbial diversity are common mechanisms between IBD and GVHD (32). Thus, the overlap between these two diseases in terms of pathogenic mechanisms suggests that targeted treatments that have been successful for one could be applied to the other (32). This is already the case for anti-TNF $\alpha$ ,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 blocking antibodies or fecal microbiota transplantation which have been used for a long time in IBD

and recently in GVHD. Finally, there is only little data on pCLE and GVHD, and the few available studies seems to show that pCLE allows to diagnose aGVHD with a good sensitivity when symptoms are already declared but is probably not sufficient on its own to predict the occurrence of aGVHD. A small pilot study published by Bojarski and al. first showed good specificity and good sensitivity for the diagnosis of GVHD compared to conventional histology when patients already had symptoms of GVHD (23). Another prospective study evaluated the diagnostic value of capsule endoscopy and pCLE for early lesions suggestive of aGVHD. The aim was to determine whether pCLE and capsule endoscopy could detect early lesions of aGVHD independently of the presence or absence of symptoms and to assess the diagnostic yield of each method separately and in combination (22). In that study, pCLE was able to detect early mucosal lesions in asymptomatic allo-HSCT patients with a good sensitivity but with a moderate specificity, while capsule endoscopy had a good specificity with a moderate sensitivity. Moreover, the results obtained with capsule endoscopy and pCLE were better correlated with the classical modified Glucksberg severity score compared to the results obtained with conventional histology. This study suggests that capsule endoscopy first and pCLE in case of a negative results could be performed in order to detect early lesions of aGVHD. However, the diagnostic value of pCLE alone does not seem sufficient (22). A recent study investigated the diagnostic value of pCLE for chronic GVHD in patients with gastrointestinal symptoms more than 100 days after allo-HSCT as compared to patients with clinically suspected aGVHD. pCLE confirmed its good diagnostic sensitivity for digestive aGVHD. However, concerning chronic GVHD, pCLE was not able to improve the diagnosis especially because it mostly failed to detect fibrosis (33). A limitation of our study is the part of the calculations concerning the crypt density and distribution not fully automated and leads to time-consuming analysis and potential interobserver variability. We overcame this bias in our study, as all our images were interpreted by a single person, trained beforehand in the software. Therefore, artificial intelligence could enable automation of these steps in order to strengthen the reproducibility of our results. Once fully automated, this analysis would

enable an standardized and reproducible update of the Miami classification, which uses qualitative variables to differentiate normal and pathological states in gastrointestinal diseases (34).

One of the secondary aims of our study was to determine if an early remodeling of the colonic mucosa occurred after allo-HSCT. Interestingly, the median perimeter of crypts was increased in allo-HSCT patients compared with controls and the crypts median sphericity and roundness were decreased in the allo-HSCT group compared to the control group. These findings suggest that during allo-HSCT, there is a first step of intestinal barrier damages before GVHD onset, which induces changes in crypt architecture, that can be evaluated using pCLE. This alteration of the intestinal barrier is thought to play a role in digestive symptoms initiation in allo-HSCT patients. This was probably the case in our study because  $\frac{1}{3}$  of patients who did not report GVHD had digestive symptoms early after allo-HSCT. Recipient intestinal barrier is usually damaged by the transplant conditioning regimen but also by underlying disease, infections, drug toxicity (1). Among these risk factors, conditioning regimen plays a major role. It induces damages to different subtypes of mature intestinal epithelial cells, tight junctions, and ISCs (8), leading to a relapse of “danger” signals, including pro-inflammatory cytokines, which maintain a local inflammation and increase the activation of recipient antigen-presenting cells (1). Otherwise ISCs, which reside in the intestinal crypts, play a pivotal role in both physiological tissue renewal and regeneration of the intestinal epithelium after injury (8). Our findings confirm crypt alteration in allo-HSCT patients, even in the absence of subsequent GVHD, suggesting that this event is not sufficient on its own to induce GVHD. However, it seems to be interesting to restore intestinal barrier integrity and modulate microenvironment as a prophylactic treatment of GVHD. A study has already shown that mouse ISCs can be protected from radiation injury and subsequent GVHD by systemic pretreatment with R-spondin-1, an ISC growth factor, which indicate that strategies to preserve ISCs may be beneficial (35).

Another aim of our study was to assess the paracellular permeability of colonic mucosa in allo-HSCT patients. Surprisingly, there was no significant difference in paracellular permeability between



patients who declared GVHD and patients who didn't. This result was not expected, because, as stated earlier, both conditioning and GVHD lead to damages of intestinal epithelial cells and tight junctions, which increase the paracellular permeability (8). One could hypothesize that increase in paracellular permeability caused by conditioning is present in both groups, which could not be confirmed because of the absence of a control group. These results could also be explained by the lack of power or the early time of the analysis, where damages caused by GVHD were not yet present.

The analysis of several cytokines of interest in biopsies explant culture, albeit performed on a small number of patients and controls, showed that secretion of 4 pro-inflammatory cytokines was increased in allo-HSCT compared to control group. After allo-HSCT, intestinal barrier and its microenvironment produced more IL6, a crucial cytokine in initiating a  $T_H17$  immune response (8), IL33, an alarm signal cytokine released upon cell injury to activate immune cells expressing the ST2 (8), IL15, which stimulates activation of natural killer cells and memory CD8 T cells and which plays a role in several autoimmune diseases (36) and IL18, involved in activation and differentiation of various T cells, participating in the  $T_H1$  immune response and being able to induce IFN $\gamma$  either with IL12 or IL15 (37). The difference was not significant concerning IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  rates et there was no difference in allo-HSCT group between patients who declared GVHD and patients who didn't. These assays were performed because pro-inflammatory cytokines play a major role in the pathophysiology of intestinal GVHD, in part by activating donor T cell populations which subsequently induce tissue damages (9). In fact, many second-line treatments, currently under evaluation, target these inflammatory cytokines, such as anti-TNF $\alpha$  (infliximab) and anti-IL6 (tocilizumab) therapies. Other drugs aim at leukocyte trafficking (38), such as vedolizumab, a monoclonal antibody directed against  $\alpha4\beta7$  integrin, which mediates migration of lymphocytes to the digestive mucosa and gut-associated lymphoid tissue and could be an option for patients with steroid-refractory digestive GVHD (39). Our results suggest that mucosal inflammation is prevalent prior to the development of GVHD because of conditioning, infection, ...etc.

In conclusion, we failed to demonstrate any difference in pCLE between patients who developed GVHD or not, or to highlight any predictor of GVHD. However, we showed a modification of the colonic microarchitecture detectable in pCLE and an increase in local inflammation in allo-HSCT patients. Our study confirms the early alteration of intestinal barrier after allo-HSCT, which may represent a first step in GVHD initiation but does not appear to be sufficient to induce the disease by itself.

## Table 1: Subjects' characteristics.

Values are n(%) unless otherwise defined.

**RAEB:** Refractory anemia with excess blasts; **ATG:** Antithymocyte globulin; **MMF:** Mycophenolate mofetil

*ns* : non significant i.e *p* value > 0.05

	Total n=19	No GVH n=8	GVH n=11	<i>p</i>
Age (years) mean ±SD	61.3 ±8	59.2 ±9.0	62.7 ±6.5	<i>ns</i>
Sex				
Male	12 (63%)	4 (50%)	8 (73%)	<i>ns</i>
Female	7(37%)	4 (50%)	3 (27%)	<i>ns</i>
BMI mean kg/cm2	25.5±2.5	25.2±2.8	25.7±2.3	<i>ns</i>
Hematologic disease				
Non-Hodgkin lymphoma	7 (37%)	3 (37%)	4 (36,%)	<i>ns</i>
Acute Leukemia	10 (53%)	5 (63%)	5 (45%)	<i>ns</i>
RAEB	2 (10%)	0 (0%)	2 (18%)	<i>ns</i>
Conditioning regimen				
Fludarabin-Busulfan-ATG	13 (68%)	6 (75%)	7 (64%)	<i>ns</i>
Clofarabin-Busulfan- ATG	6 (32%)	2 (25%)	4 (36%)	<i>ns</i>
GVH Prophylaxis				
Cyclosporin	7 (37%)	3 (38%)	4 (36%)	<i>ns</i>
Cyclosporin + MMF	12 (63%)	5 (62%)	7 (64%)	<i>ns</i>
Graft type				
Peripheral blood stem cell	19 (100%)	8 (100%)	11 (100%)	<i>ns</i>
HLA matching				
Matched related donor	10 (53%)	5 (62%)	5 (45%)	<i>ns</i>
Matched unrelated donor	9 (47%)	3 (38%)	6 (55%)	<i>ns</i>
CMV matching	15 (79%)	6 (75%)	9 (82%)	<i>ns</i>
Sex matching	9 (47%)	4 (50%)	5 (45%)	<i>ns</i>

## REFERENCES

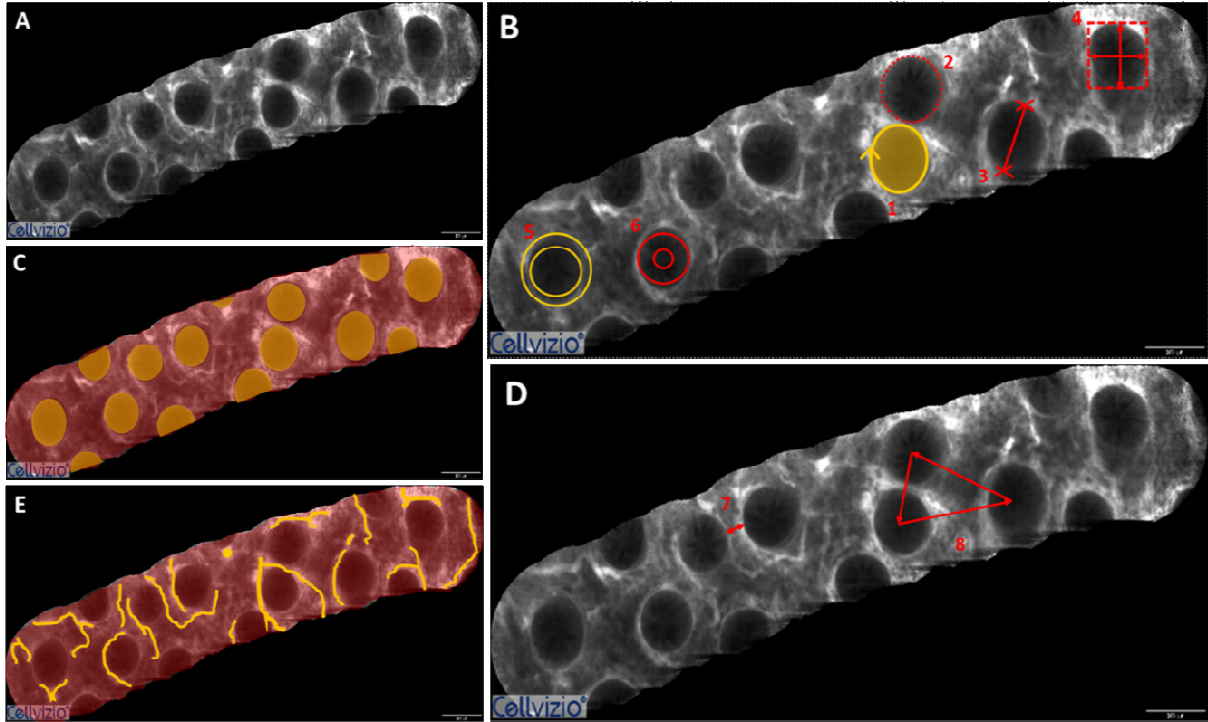
1. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-Host Disease. *Lancet*. 2009 May 2;373(9674):1550–61.
2. Late mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation and functional status of long-term survivors: report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study | *Blood* | American Society of Hematology [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://ashpublications-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/blood/article-lookup/doi/10.1182/blood-2007-03-082933>
3. 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005 Dec 1;11(12):945–56.
4. 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.
5. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
6. Advances in predicting acute GVHD - Harris - 2013 - *British Journal of Haematology* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/full/10.1111/bjh.12142>
7. Lee C, Haneuse S, Wang H-L, Rose S, Spellman SR, Verneris M, et al. Prediction of absolute risk of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation. *PLOS ONE*. 2018 Jan 18;13(1):e0190610.
8. Peled JU, Hanash AM, Jenq RR. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Blood*. 2016 Nov 17;128(20):2395–402.
9. Piper C, Drobycki WR. Inflammatory Cytokine Networks in Gastrointestinal Tract Graft vs. Host Disease. *Front Immunol*. 2019;10:163.
10. Levine JE. Implications of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. 2011 May;93(5):571–7.
11. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, et al. A PROGNOSTIC SCORE FOR ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE BASED ON BIOMARKERS: A MULTICENTER STUDY. *Lancet Haematol*. 2015 Jan 1;2(1):e21–9.
12. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, et al. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight*. 2017 09;2(3):e89798.
13. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018 21;131(25):2846–55.

14. Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Hum Pathol*. 2009 Jul;40(7):909–17.
15. Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H, Harder J, Potthoff K, Deibert P, et al. Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Mar;47(3):430–8.
16. Shulman HM, Cardona DM, Greenson JK, Hingorani S, Horn T, Huber E, et al. NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Apr;21(4):589–603.
17. Levine JE, Huber E, Hammer STG, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, et al. Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1505–9.
18. Abraham J, Janin A, Gornet J-M, de Latour RP, Robin M, Xhaard A, et al. Clinical Severity Scores in Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation*. 2013 Dec;1-
19. Lin J, Fan R, Zhao Z, Cummings OW, Chen S. Is the presence of 6 or fewer crypt apoptotic bodies sufficient for diagnosis of graft versus host disease? A decade of experience at a single institution. *Am J Surg Pathol*. 2013 Apr;37(4):539–47.
20. Sierra A, Ecochard-Dugelay E, Bellaïche M, Tilea B, Cavé H, Viala J. Biopsy-Induced Duodenal Hematoma Is Not an Infrequent Complication Favored by Bone Marrow Transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63(6):627–32.
21. Lipson SA, Perr HA, Koerper MA, Ostroff JW, Snyder JD, Goldstein RB. Intramural duodenal hematoma after endoscopic biopsy in leukemic patients. *Gastrointestinal Endoscopy*. 1996 Nov 1;44(5):620–3.
22. Coron E, Laurent V, Malard F, Le Rhun M, Chevallier P, Guillaume T, et al. Early detection of acute graft-versus-host disease by wireless capsule endoscopy and probe-based confocal laser endomicroscopy: results of a pilot study. *United European Gastroenterol J*. 2014 Jun;2(3):206–15.
23. Bojarski C, Günther U, Rieger K, Heller F, Loddenkemper C, Grünbaum M, et al. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy*. 2009 May;41(5):433–8.
24. Quénéhervé L, David G, Bourreille A, Hardouin JB, Rahmi G, Neunlist M, et al. Quantitative assessment of mucosal architecture using computer-based analysis of confocal laser endomicroscopy in inflammatory bowel diseases. *Gastrointest Endosc*. 2019;89(3):626–36.
25. 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.
26. De Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):690–6.

27. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671–5.
28. Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):1132–42.
29. Srinagesh HK, Ferrara JLM. MAGIC biomarkers of acute graft-versus-host disease: Biology and clinical application. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019;32(4):101111.
30. Wild D, Sung AD, Cardona D, Cirrione C, Sullivan K, Detweiler C, et al. The Diagnostic Yield of Site and Symptom-Based Biopsies for Acute Gastrointestinal Graft-Versus-Host Disease: A 5-Year Retrospective Review. *Dig Dis Sci*. 2016 Mar 1;61(3):806–13.
31. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease — Biologic Process, Prevention, and Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2017 Nov 30;377(22):2167–79.
32. Nalle SC, Turner JR. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal Immunol*. 2015 Jul;8(4):720–30.
33. Rieger K, Günther U, Erben U, Kühl A, Loddenkemper C, Pezzutto A, et al. Confocal endomicroscopy in diagnosis of intestinal chronic graft-versus-host disease. *Hematol Oncol*. 2018 Feb;36(1):291–8.
34. Wallace M, Lauwers G, Chen Y, Dekker E, Fockens P, Sharma P, et al. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy*. 2011 Oct;43(10):882–91.
35. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):285–94.
36. Waldmann TA, Miljkovic MD, Conlon KC. Interleukin-15 (dys)regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1).
37. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev*. 2018;281(1):138–53.
38. Renteria AS, Levine JE, Ferrara JLM. Therapeutic targets and emerging treatment options in gastrointestinal acute graft-versus-host disease. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016;4(5):469–84.
39. Floisand Y, Lazarevic VL, Maertens J, Mattsson J, Shah NN, Zachée P, et al. Safety and Effectiveness of Vedolizumab in Patients with Steroid-Refractory Gastrointestinal Acute Graft-versus-Host Disease: A Retrospective Record Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):720–7.

## Figures

Figure 1: Analyze of cryptometry parameters in pCLE.



**A** representative image as obtained after pCLE film mosaicking **(A)**. **Display of measured architectural parameters of the crypts (B)**: Sphericity (1), Perimeter (2), Maximal Feret Diameter defined by the maximal distance between 2 points of the perimeter (3), Ma/ma ratio defined by the ratio between the width and the height of the box containing the crypt (4), Elongator factor defined by the ratio between the minor diameter and the major diameter (5), Roundness defined by the normalized ratio between radii of the minimum and maximum circles written in the form (6). **Display of crypt density measurement (C)** defined by the ratio of the crypt area and the area of the field of view. **Display of distribution measurements (D)**: Wall thickness defined by the distance between nearest neighbor crypt (7), Minimal and mean between the geometrical centers of neighbor crypts (8). **Display of vessel area measurement (E)**: Mean vessel area defined by the ratio between the vessel area and the area of the field of view.

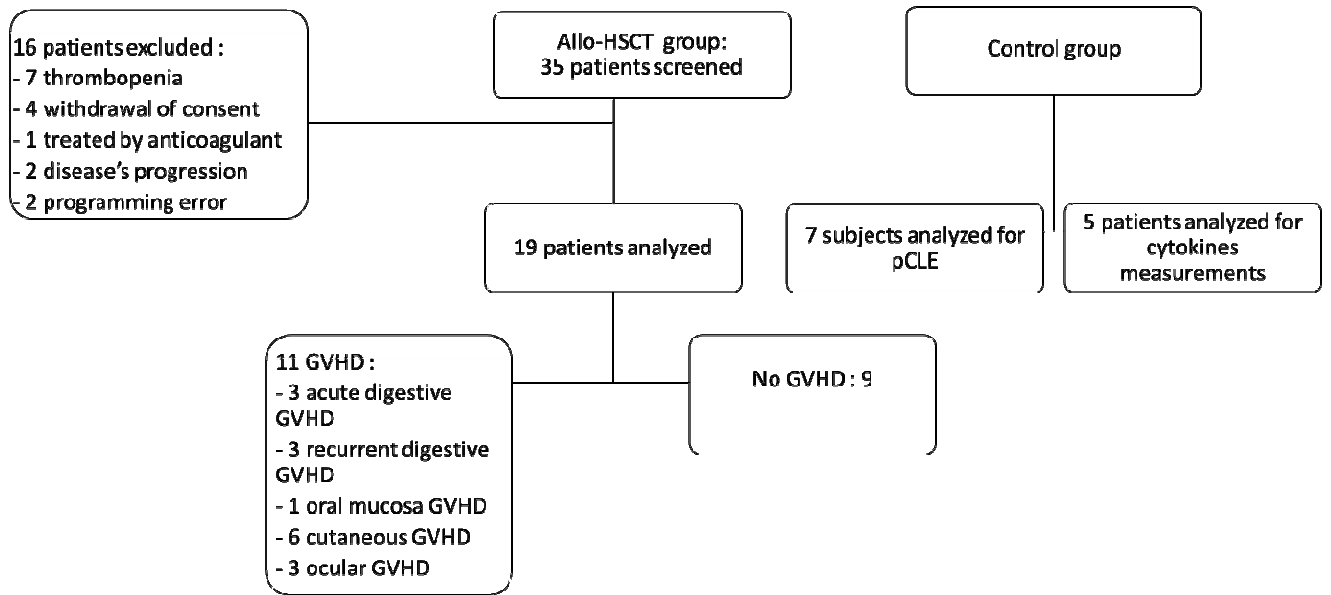
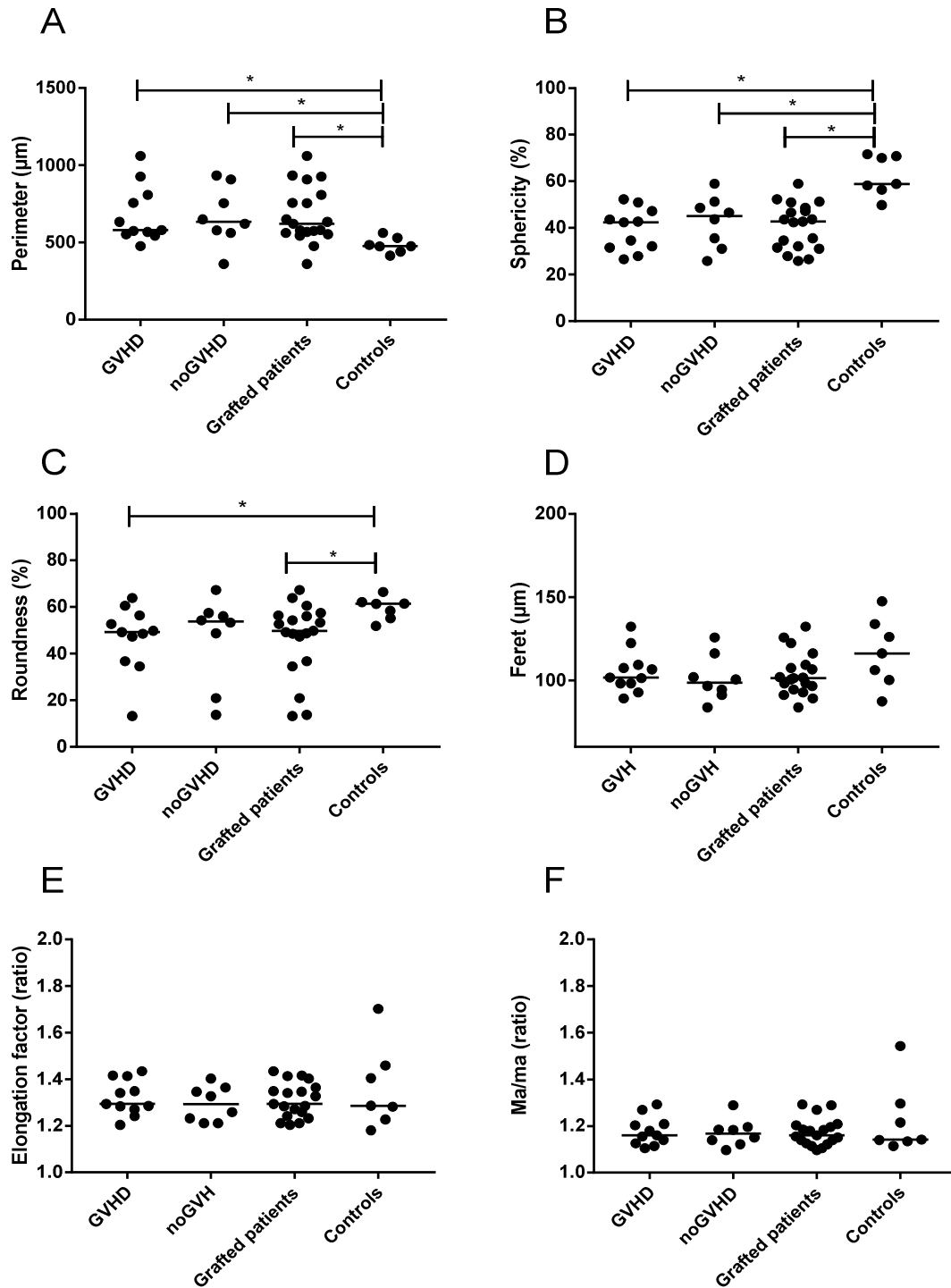


Figure 2: Flow chart

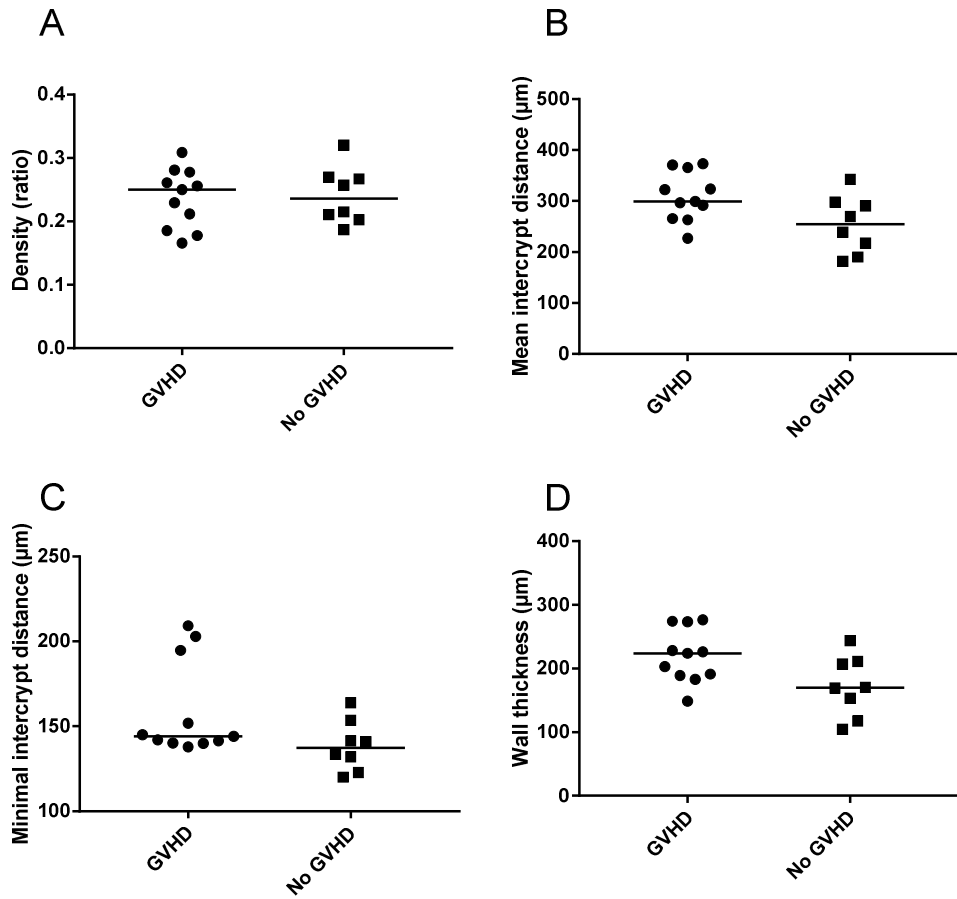




**Figure 3: Crypt architectural parameters in pCLE.**

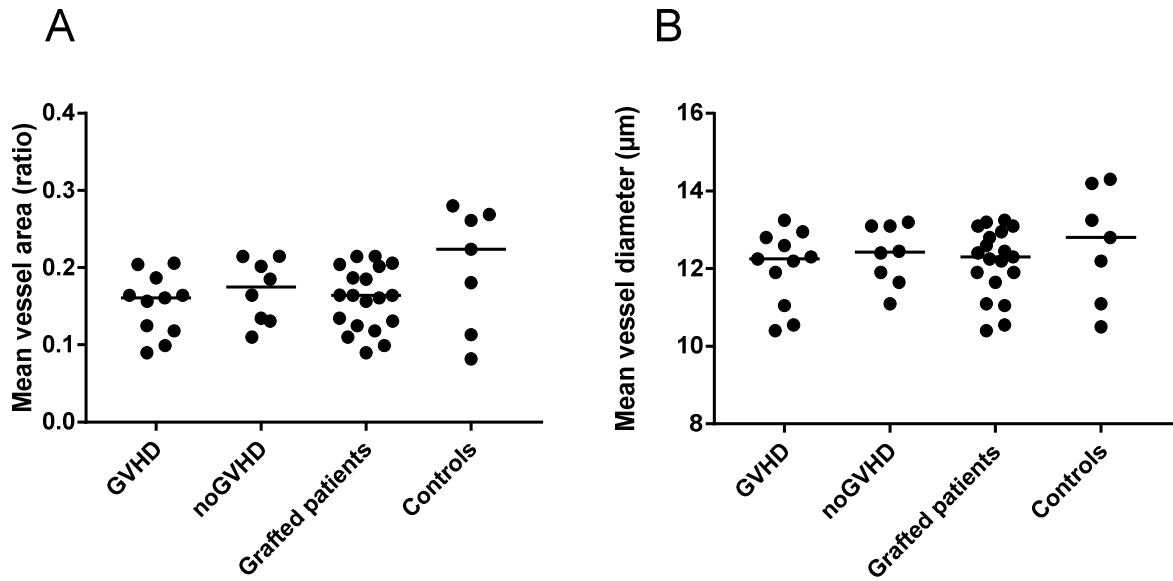
Comparison of perimeter (A), sphericity (B), roundness (C), maximal feret diameter (D), elongation factor (E) and Ma/ma ratio (F) between GVHD, no GVHD groups and controls and between allo-grafted patients and controls.

\*  $p < 0.05$



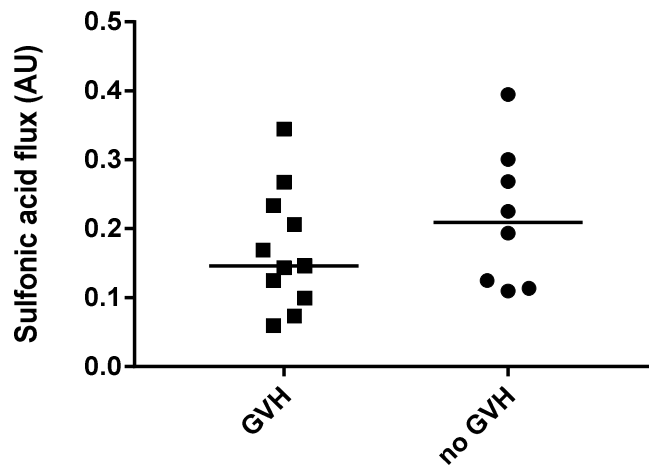
**Figure 4: Crypt density and distribution in pCLE.**

Comparison of crypt density (A), mean intercrypt distance (B), minimal intercrypt distance (C) and wall thickness (D) between GVHD and noGVHD groups.



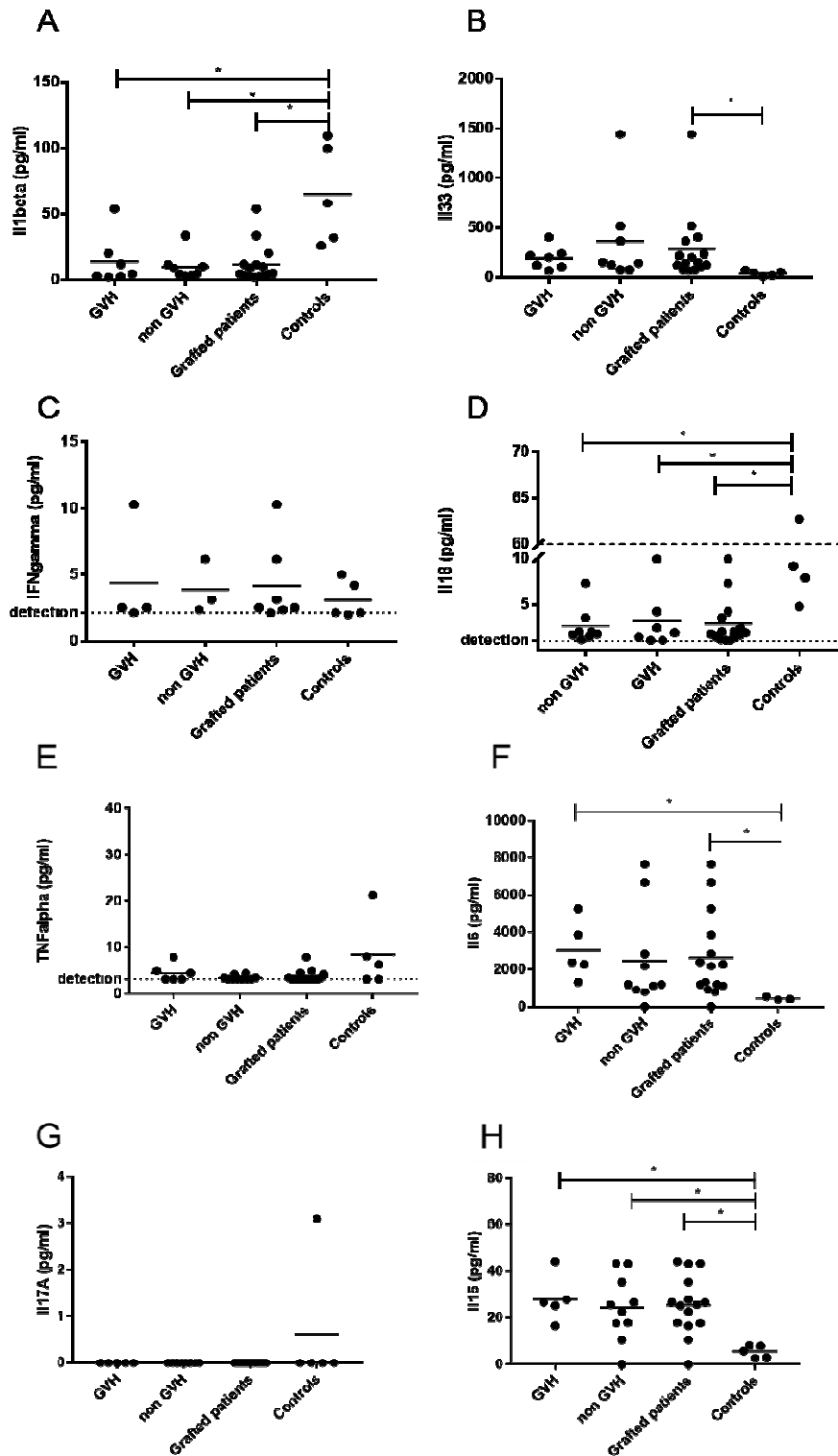
**Figure 5: Vessel parameters of the crypts in pCLE**

Comparison of mean vessel area (A) and mean vessel diameter (B) between GVHD, no GVHD groups and controls and between allo-grafted patients and controls.



**Figure 6: Paracellular permeability**

Comparison of paracellular permeability between GVHD and noGVHD groups.



**Figure 7: Pro-inflammatory cytokines in colonic explant cultures**

Comparison of IL1beta (A), IL33 (B), IFNgamma (C), IL18(D), TNFalpha (E), IL6 (F), IL17A (G), IL15 (H) rates, between GVHD, no GVHD groups and controls and between allo-grafted patients and controls. The rates are expressed in pg/mL.

\* p<0.05

**Vu, le Président du Jury,**

(tampon et signature)



Professeur Emmanuel CORON

**Vu, le Directeur de Thèse,**

(tampon et signature)



Docteur Lucille QUENEHERVE

**Vu, le Doyen de la Faculté,**



Professeur Pascale JOLLIET

**Titre de Thèse : ALTERATIONS PRECOCES DE LA MUQUEUSE COLIQUE APRES GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES ALLOGENIQUES : ETUDE PROSPECTIVE SUR 19 PATIENTS**

---

**Introduction.** Le développement de facteurs prédictifs de maladie du greffon contre l'hôte (GVH), principale complication de la greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques, est nécessaire pour optimiser le traitement immunosuppresseur. Les objectifs de cette étude pilote monocentrique prospective étaient de déterminer si l'étude de la muqueuse colique en endomicroscopie confocale (EMC) permettait de prédire la survenue d'une GVH et si un remodelage précoce de la muqueuse colique était mis en évidence après allogreffe. **Patients et Méthodes :** Entre J21 et J28 après l'allogreffe, 19 patients ont été inclus dans l'étude et ont eu une rectosigmoïdoscopie avec enregistrement d'EMC et biopsies. Douze sujets non greffés ont servi de contrôle. L'étude de paramètres morphologiques (EMC), fonctionnel (perméabilité intestinale) et inflammatoires a été réalisée. **Résultats.** Parmi les patients allogreffés, 11 (58%) ont déclaré une GVH. Aucune différence de paramètres d'EMC, de perméabilité ou inflammatoires n'a été mise en évidence chez les patients déclarant une GVH par rapport aux non GVH. Concernant l'objectif secondaire, le périmètre médian des cryptes était augmenté tandis que leurs sphéricité et rondeur étaient diminuées chez les patients allogreffés par rapport aux contrôles. De plus, les taux d'IL6, IL33, IL18, IL15 au niveau de la muqueuse colique étaient augmentés chez les patients allogreffés par rapport aux contrôles.

**Conclusion.** Cette étude pilote du remodelage de la muqueuse après allogreffe n'a pas permis d'identifier de facteurs prédictif de GVH. En revanche, nous avons mis en évidence une modification de la muqueuse digestive chez ces patients allogreffés, qui pourrait jouer un rôle contributif mais insuffisant à lui seul, dans le développement de la GVH.

**MOTS-CLES : Greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques ; Maladie du greffon contre l'hôte ; Anomalies précoces ; Muqueuse colique ; Endomicroscopie confocale ; Perméabilité intestinale ; Cytokines inflammatoires.**

---

**Introduction.** The main complication of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) is graft-versus-host disease (GVHD). Therefore, it is necessary to develop predictive factors in order to optimize the immunosuppressive therapies. The aims of this prospective, monocentric, pilot study were to determine if the study of colonic mucosa in probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) made it possible to predict the occurrence of GVHD and if an early remodeling of the colonic mucosa occurred after allo-HSCT. **Methods.** Between day 21 and day 28 after the allo-HSCT, 19 allo-HSCT patients were included and had a rectosigmoidoscopy with a pCLE record and biopsies. Twelve patients were in the control group.

Study of morphologic (pCLE), functional (intestinal permeability) and inflammatory parameters were performed. **Results.** Among allo-HSCT patients, 11 patients (58%) recorded GVHD. There was no difference of pCLE, intestinal permeability and inflammatory parameters between patients who had GVHD and those who didn't. Regarding the secondary aim, the median perimeter of the crypts was increased while their sphericity and roundness were decreased in allo-HSCT patients compared to controls. In addition, IL6, IL33, IL18, IL15 rates in colonic mucosa samples were increased in allo-HSCT patients compared to controls.

**Conclusion.** This pilot study of mucosal remodeling after allo-HSCT did not identify any predictive factors of GVHD. However, we have highlighted a modification of the digestive mucosa in these allo-HSCT patients, which could play a contributing role but insufficient in itself, in the development of GVHD.

**KEY WORDS : Allogeneic hematopoietic stem cells transplantation, Graft-versus host disease; Early abnormalities ; Colonic mucosa; probe-based confocal laser endomicroscopy ; Intestinal permeability ; Inflammatory Cytokines.**