

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2012

N°37

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité Hématologie Clinique

par

Eolia Brissot

Née le 16 Juillet 1980

Présentée et soutenue publiquement le *26 Juin 2012*

Etablissement d'un score prédictif de la réaction du greffon
contre l'hôte (GVH) chronique extensive en allogreffe
de cellules souches hématopoïétiques

Président de thèse :

Monsieur le Professeur Philippe MOREAU

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Mohamad MOHTY

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Steven Le GOUILL
Madame le Professeur Magali GIRALD-CLASSE
Monsieur le Docteur Patrice CHEVALLIER

Sommaire

Listes des abréviations	4
Liste des figures	6
Liste des tableaux.....	7
Introduction	9

Partie 1- L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

.....	12
1.1. Définition	12
1.2. Historique.....	12
1.3. Les étapes de l'allogreffe.....	17
1.4. Les indications.....	17
1.5. Les sources de greffon	19
1.6. Choix du donneur	19
1.6.1. Les donneurs vivants	20
1.6.2. Le sang de cordons placentaires	20
1.7. Le conditionnement.....	21
1.7.1. Le conditionnement myéloablatif :.....	21
1.7.2. Le conditionnement d'intensité réduite :.....	21
1.8. Réaction du greffon contre la leucémie ou contre la tumeur (GvL ou GvT).....	22
1.9. Complications.....	22
1.9.1. Complications infectieuses.....	22
1.9.2. Complications liées à la toxicité du traitement	23
1.9.3. Les conflits immunologiques.....	24

Partie 2 : La maladie chronique du greffon contre l'hôte et cytokines

25

2.1. La maladie chronique du greffon contre l'hôte (GVH chronique).....	25
2.1.1 Définition et épidémiologie	25
2.1.2.1. Facteurs de risque et prévention.....	26
2.1.2.2. Symptômes cliniques et biologiques de la GVH chronique	27

2.1.3.	Mode et chronologie de survenue.....	29
2.1.4.	Critères diagnostiques et de sévérité de la GVH chronique.....	30
2.1.5.	GVH chronique et atteinte du système immunitaire.....	32
2.1.6.	GVH chronique et infections.....	33
2.1.7.	Traitements.....	33
2.2.	Les cytokines.....	34
2.2.1.	Définition.....	34
2.2.2.	Classification des cytokines.....	35
2.2.2.1.	Les grandes familles de cytokines.....	35
2.2.2.2.	Cytokines et polarisation des lymphocytes CD4+ effecteurs.....	37
2.3.	GVH chronique et cytokines.....	40

Partie 3 - Etablissement d'un score clinico-biologique prédictif de la survenue d'une GVH chronique extensive ... 43

3.1.	Objectifs de l'étude.....	43
3.2.	Patients, matériels et méthodes.....	43
3.2.1.	La population étudiée.....	43
3.2.2.	Echantillons et dosage de cytokines.....	45
3.2.3.	Analyses statistiques.....	47
3.2.3.1.	Etude des corrélations.....	47
3.2.3.2.	Construction de la signature prédictive.....	47
3.2.3.3.	Analyse des corrélations entre les signatures et la mortalité non-liée à la rechute.....	48
3.2.	Résultats.....	49
3.3.1.	Devenir des patients.....	49
3.3.2.	Corrélation entre les cytokines et la survenue d'une GVH chronique extensive..	51
3.3.2.1.	Analyses univariées.....	51
3.3.2.2.	Analyses multivariées.....	53
3.3.3.	La signature globale prédictive de survenue de la GVH chronique extensive dans les 2 ans post-allogreffe.....	54
3.3.4.	Etude de la mortalité non liée à la rechute (NRM).....	55
3.4.	Discussion.....	56

Conclusion 62

Références 63

Listes des abréviations

HLA : Human Leucocyte Antigen

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

GVH : réaction du greffon contre l'hôte

Effet GVL : Effet du greffon contre la leucémie

Effet GVT : Effet du greffon contre la tumeur

CSP : Cellules Souches Périphériques

LAM : Leucémies Aigues Myéloïdes

RC : Rémission Complète

DLI : Injection des Lymphocytes du Donneur

CMV : cytomégalovirus

EBV : Epstein Barr Virus

IL: Interleukine

TNF: Tumor Necrosis Factor

IFN: Interféron

G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor

NRM: Mortalité non liée à la rechute (Non Relapse Mortality)

AHAI : Anémie Hémolytique Auto-Immune

PTI : Purpura Thrombopénique Idiopathique

NIH: National Institute of Health

Ig: Immunoglobuline

T reg: Lymphocytes T régulateurs

T_H: Lymphocytes T auxiliaires ou effecteurs

T_c : Lymphocytes T cytotoxiques

J100 : Centième jour après la greffe

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératif

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- méthode immuno-enzymatique

ROct : Receiver Operating Characteristic – courbe de sensibilité/spécificité dépendante du temps

AUC : Area Under the Curve- aire sous la courbe

Liste des figures

Figure 1 . Nombre d'allogreffes rapportées entre 1958 et 1968 par Bortin et coll.(10)	14
Figure 2 . Histoire et évolution de l'allogreffe de CSH de 1957 à 2006	16
Figure 3. Evolution du nombre d'allogreffes de CSH à Nantes de 1983 à 2010.....	16
Figure 4. Etapes de l'allogreffe de CSH.....	17
Figure 5. Evolution des indications d'allogreffes selon les pathologies	18
Figure 6. Evolution des indications d'allogreffe selon les pathologies de 1983 à 2011 dans le Service d'hématologie de Nantes	18
Figure 7. Répartition des sources de greffon chez les patients allogreffés à Nantes entre 1983 et 2010	19
Figure 8 A et B. Atteinte épidermique de la GVH chronique.	29
Figure 9. La différenciation des cellules T est dirigée par les cellules dendritiques et les cytokines.	38
Figure 10. Principales sous-population T _H issues de la différenciation des cellules T CD4 naïves.	39
Figure 11. Différenciation des lymphocytes T en effecteur selon Zhu et coll.(2).....	40
Figure 12 A, B et C. Principes de la technique multiplex.....	46
Figure 13. Principe du « boot-strap ».....	48
Figure 14 A, B et C. Courbe de survie de la population (A). Incidence cumulée de survenue de GVH chronique (B). Incidence cumulée de survenue de GVH chronique extensive (C).....	50
Figure 15. Courbes ROC du score prédictif de survenue des GVH chroniques extensives.	55
Figure 16. La mortalité non liée à la rechute.....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 17. Mortalité non liée à la rechute selon le score de survenue de GVH chronique extensive	56

Liste des tableaux

Tableau I. Symptômes cliniques de la GVH chronique selon critères du NIH (3).....	28
Tableau III. Classification de la GVH aiguë et chronique selon Filipovich et coll.(3).....	30
Tableau II. Classification de la GVH selon Shulman et coll. (1)	31
Tableau IV. Facteurs contribuant à l'immunodéficience et aux risques d'infections opportunistes dans un contexte de GVH chronique (7).....	32
Tableau V. Révision des critères de Billingham portant sur le développement de la GVH selon Sackstein et coll. (4)	41
Tableau VI. Caractéristiques de la population et des paramètres de l'allogreffe de CSH.....	44
Tableau VII. Analyse uni-variée des facteurs cliniques.....	52
Tableau VIII : Analyse univariée des dosages cytokiniques.....	53
Tableau IX. Analyse multivariée des cytokines en prenant en compte les paramètres cliniques	54
Tableau X. Eléments du score prédictif de survenue de la GVH chronique extensive	54

Introduction

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une immunothérapie efficace pour le traitement de nombreuses pathologies hématologiques malignes, les déficits immunitaires et les hémoglobinopathies sévères. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières décennies, en particulier en ce qui concerne la diversité des sources de CSH accessibles et l'apparition de conditionnements non myéloablatifs ou d'intensité réduite permettant de proposer l'allogreffe à des sujets plus âgés (au-delà de 50 ans) ou ayant des comorbidités. Cette thérapeutique s'est donc développée passant à quelques cas par an dans les années 80 à plus de 1500 allogreffe de CSH /an réalisées en France actuellement. L'équipe d'hématologie nantaise est d'ailleurs un des centres les plus impliqués en France sur cette thérapeutique.

La complexité et le succès de l'allogreffe de CSH résultent de l'immunosuppression des cellules du système immunitaire du receveur par le conditionnement et de la reconstitution immunitaire à partir des cellules souches dérivées du greffon. Ce contexte conflictuel est à l'origine d'une complication majeure : la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Cette affection peut être définie comme aiguë (survenant les premiers mois) ou chronique, principale complication à moyen et long terme. La GVH chronique est une complication fréquente dont l'incidence varie entre 40 à 70% selon les séries (11, 12). Alors que l'utilisation prophylactique de traitements immunosuppresseurs a permis de diminuer l'incidence et la sévérité de la GVH aiguë, l'incidence de la GVH chronique continue de progresser en raison de l'augmentation du nombre d'allogreffes réalisées due principalement à l'âge de plus en plus avancé des patients. Malgré l'effet anti-tumoral associé, la GVH chronique est à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importantes. La mortalité non liée à la rechute (NRM) chez des patients développant une GVH chronique varie de 5 à 72% à 5 ans selon la sévérité de l'affection(13). La principale étiologie de NRM est l'infection secondaire à l'immunodépression induite par la GVH chronique elle-même et par les immunosuppresseurs traitant la GVH. Un point important est l'altération de la qualité de vie par la GVH chronique chez ces patients ayant déjà eu un long parcours médical. Plusieurs études prospectives ont montré que le développement de la GVH chronique était liée à une diminution du score de performance de Karnofsky, à une diminution de la qualité de vie, à un risque accru de dépression et à un retour plus tardif au travail (14,

15). Ces paramètres varient selon la sévérité de la GVH chronique qui selon les caractéristiques de limitée à extensive selon la classification de Seattle de 1980 (1) ou de légère à sévère selon la classification du NIH de 2005 (3).

La GVH chronique est une pathologie de type allo-immun dont la physiopathologie reste mal connue et fait l'objet de plus en plus de travaux de recherche. Les données expérimentales tendent à prouver que la physiopathologie de la GVH est bien plus complexe que celle de la maladie aiguë. La présentation clinique est d'ailleurs particulièrement polymorphe et certaines atteintes ressemblent à celles observées au cours des maladies auto-immunes.

Si les lymphocytes T ont un rôle prépondérant dans la GVH et dans la réaction du greffon contre la tumeur (GVT ou GVL), le rôle des lymphocytes B et des cellules dendritiques est de mieux en mieux défini, ces cellules occupant une place majeure dans cette réaction immunologique. Les cytokines présentes dans l'environnement cellulaire et celles produites au cours de l'activation lymphocytaire orientent le développement de la réponse immunitaire. Ces protéines constituent un vaste réseau qui régule les interactions cellulaires au sein du système immunitaire et assure ses relations avec les autres systèmes de l'organisme. Elles jouent un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire. Initialement, dans la GVH chronique, cette réponse immunitaire avait été décrite comme orientée de type T_H2 mais ce paradigme est actuellement remis en cause dans plusieurs études (16, 17).

Pour apporter des éléments de réponse, nous avons étudié de façon rétrospective les caractéristiques cliniques ainsi que le dosage sérique à J100 de 41 cytokines de 152 patients allogreffés dans le service d'Hématologie de Nantes entre 2005 et 2008. Les cytokines choisies étaient principalement décrites soit dans la réaction du greffon contre l'hôte soit dans des pathologies auto-immunes. Nous nous sommes focalisés sur la GVH chronique extensive en raison de l'intérêt clinique.

Tout d'abord, nous avons étudié s'il existait une corrélation entre d'une part la survenue d'une GVH chronique extensive et d'autre part les caractéristiques de la greffe associées au dosage cytokinique. Puis, nous avons établi un score prédictif de survenue de GVH chronique extensive dans la perspective d'une utilisation en pratique clinique.

Nous aborderons d'abord l'histoire, les caractéristiques et les complications de l'allogreffe de CSH. Puis nous présenterons la GvH chronique et le rôle des cytokines dans le système immunitaire. Nous exposerons alors notre étude bio-clinique et discuterons les résultats avant de conclure sur l'intérêt potentiel du score prédictif établi.

Partie 1- L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

1.1. Définition

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est une procédure thérapeutique complexe reconnue comme efficace et curative pour de nombreuses hémopathies. Le concept initial était celui de détruire la moelle osseuse du receveur (moelle pathologique) et de la reconstituer avec un greffon prélevé sur un donneur compatible.

Aujourd'hui, ce concept de remplacement de la moelle malade par une moelle saine a évolué même s'il reste le fondement de la thérapeutique de certains déficits immunitaires graves ou de certaines formes graves d'hémoglobinopathies ou d'autres maladies génétiques des cellules hématopoïétiques. En effet, la reconstitution hématopoïétique et immunitaire post-allogreffe s'accompagne d'une interaction entre le système immunitaire issu du greffon et les tissus du patient receveur. Ces interactions peuvent générer un conflit entre donneur et receveur, source à la fois d'un effet bénéfique (destruction des cellules tumorales effet greffon contre maladie) et de complications (maladie du greffon contre l'hôte). L'allogreffe doit donc plutôt être perçue comme une thérapie cellulaire anti-tumorale, lorsqu'elle est utilisée dans la stratégie thérapeutique des hémopathies malignes.

1.2. Historique

- Les débuts de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Après l'explosion des bombes atomiques au Japon en 1945, le monde scientifique et médical a commencé à explorer l'effet de l'irradiation sur l'hématopoïèse constituant ainsi les prémices de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. En étudiant les effets des irradiations létales dans le modèle murin, Jacobson et coll. (1949) découvrirent l'intérêt de protéger la rate et les fémurs des radiations, permettant ainsi une reconstitution hématologique. La rate et les fémurs contenaient du tissu hématopoïétique (18, 19). Un an plus tard, Lorenz et coll. montraient que cet effet protecteur pouvait être créé par infusion de moelle osseuse par voie intra-veineuse

(20). Au cours des cinq années suivantes, il fut montré que les cellules de moelle osseuse issues de donneurs syngéniques permettaient de repeupler la moelle osseuse irradiée du receveur (21). Un animal recevant une système hématopoïétique d'un autre animal après irradiation est alors appelé chimère (22). En 1958, six physiciens ont développé une aplasie médullaire suite à un accident nucléaire en Yougoslavie. Mathé et coll. réalisèrent une infusion de moelle osseuse chez cinq de ces patients ayant permis une reconstitution, tout au moins transitoire, de l'hématopoïèse (23).

- Les premières tentatives d'allogreffe de CSH

En 1959, le premier cas de prise de greffe chez un patient atteint d'une leucémie avec un donneur syngénique fut décrit par Thomas et coll.(24). Puis dans les années 1960, Beilby et coll. rapportèrent le cas d'un patient atteint d'un lymphome de Hodgkin ayant été allogreffé avec un donneur non apparenté après injection d'une dose trop forte de chlorambucil. Il fut observé une reconstitution hématopoïétique partielle. Au total dans les années 1960, 19 cas d'allogreffe (25) ont été décrits, 13 sont décédés sans prise de greffe, deux ont une reprise autologue. Les quatre autres patients, greffés avec leur jumeau, montrèrent une prise du greffon temporaire. Tous cependant rechutèrent dans les trois mois.

La plupart des travaux de recherche ont été initialement réalisés par l'équipe d'E.D. Thomas à Seattle à partir d'expériences sur un modèle canin. Les deux problèmes majeurs associés à l'allogreffe furent le rejet du greffon et la maladie du greffon contre l'hôte ou GvHD (graft-versus-host disease) -initialement appelée « syndrome ou maladie secondaire ». Ces syndromes secondaires apparaissaient après prise de greffe et se caractérisaient par des diarrhées, une perte de poids, des lésions cutanées et une atteinte hépatique. En 1966, Billingham et coll. décrivirent les 3 critères nécessaires au développement d'une maladie du greffon contre l'hôte :

- le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes
- il doit exister une incompatibilité antigénique entre l'hôte et le greffon
- et l'hôte ne peut pas mettre en place une réaction immunologique de rejet contre le greffon (26).

Cependant, en 1966, sur un total de 417 allogreffes, 3 succès prolongés seulement furent obtenus...(10) Au vu de ces résultats décevants, de nombreuses équipes considèrent l'allogreffe de CSH comme un traitement sans avenir (Fig. 1) (27).

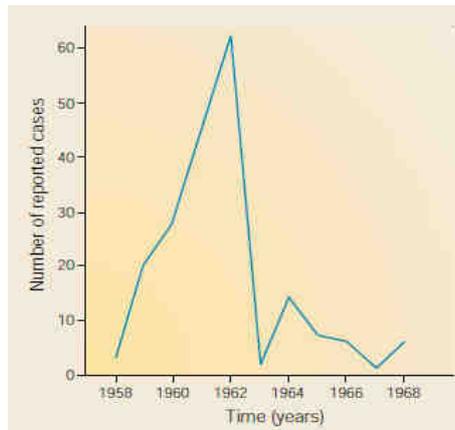


Figure 1 . Nombre d'allogreffes rapportées entre 1958 et 1968 par Bortin et coll.(10)

La découverte du système complexes majeurs d'histocompatibilité ou human leucocyte antigen (HLA) par J.Dausset fut un tournant décisif en allogreffe de CSH(28) . A partir des années 1970, les équipes réalisèrent, dans le cadre du traitement des leucémies aiguës et des aplasies médullaires, des allogreffes de CSH avec un donneur familial di « géno-identique ». L'utilisation du méthotrexate post-allogreffe permit d'améliorer la prise de greffe et de diminuer la GvH (29). La ciclosporine a été introduite dans les années 80 et son association avec le méthotrexate permit une réduction importante de la GvH (30).

- Historique de la réaction du greffon contre la leucémie ou tumeur (GvL ou GvT)

L'existence d'un effet de la greffe contre la tumeur après allogreffe des CSH a été prédit dès 1956 sur la base d'expériences murines. Barnes et coll ont été les premiers à rapporter l'effet GvL en étudiant l'éradication des cellules leucémiques chez des souris irradiées ayant reçu un greffon allogénique et non syngénique (31). En 1981, le groupe de Seattle rapportait une incidence de rechute réduite chez les patients ayant développé une GvH aiguë et/ou chronique. A partir des années 1980, plusieurs études montrèrent la corrélation entre la survenue de la GVH et une meilleure survie sans rechute. Alors que la survenue d'une GvH aiguë n'était pas associée à une amélioration de la survie en raison d'une augmentation importante de la mortalité liée à la greffe, la survenue d'une GvH chronique était, quant à elle, associée à une augmentation de la survie (32-34). D'autres études ont démontré une augmentation du risque de rechute

chez les patients ayant reçu une greffe syngénique, par comparaison avec ceux ayant reçu une greffe allogénique.

Le rôle prépondérant des cellules T du greffon dans l'effet GvL a été mis en évidence par la démonstration d'une augmentation du risque de rechute chez les patients recevant une greffe déplétée en lymphocytes T (35). Ces observations ont incité Kolb et coll. à transfuser des lymphocytes du donneur (DLI) chez les patients ayant rechuté après allogreffe (36). Depuis, l'effet antileucémique des DLI a été largement démontré permettant des régressions tumorales complètes, plus particulièrement dans la leucémie myéloïde chronique. L'utilisation avec succès de cette thérapeutique s'est accompagnée néanmoins de complications parfois graves telle que la GVH (37).

- Des années 1980 à aujourd'hui

Dans les années 1980, on assiste à une augmentation rapide et importante du nombre d'allogreffes avec l'apparition de donneurs non apparentés et l'amélioration des techniques de cryo-préservation des greffons.

Les événements majeurs ayant contribué au développement de l'allogreffe sont :

- L'apparition de deux nouvelles sources de greffon : le sang de cordon placentaire et les cellules souches périphériques. En 1988 est réalisée la première greffe de sang de cordon chez un enfant atteint d'un syndrome de Fanconi par Gluckman et coll (38). L'utilisation de cette source de greffon a été élargie aux adultes à partir des années 2000. A partir de 1995, se sont développées les études sur les cellules souches périphériques (CSP) obtenues par aphérèse après mobilisation par injection de facteur de croissance se sont développées. Actuellement, les CSP représentent la source principale de greffon (environ 75%).

- Le développement des conditionnements à intensité réduite permettant de réaliser cette procédure chez des patients de plus de 50 ans ou présentant des comorbidités.

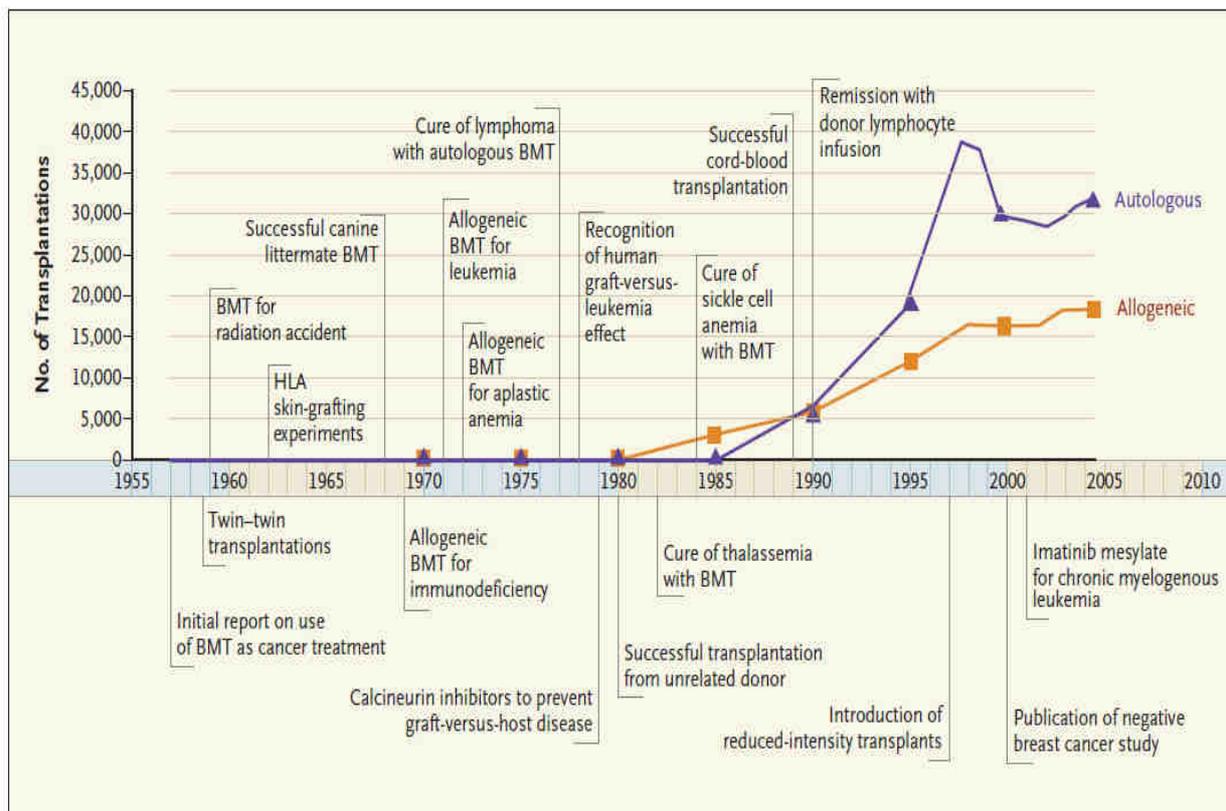


Figure 2 . Histoire et évolution de l'allogreffe de CSH de 1957 à 2006

données du CIBMTR (Center from International Blood and Marrow Transplantation Research) Appelbaum et coll. N Engl J Med 2007 (9)

Grâce aux nouveaux conditionnements d'intensité réduite, à l'élargissement du type de greffon, à l'amélioration de la prise en charge des complications infectieuses et des soins de supports et à l'évolution des indications, le nombre d'allogreffes réalisées a augmenté de 37% depuis 2005 (Fig. 2). En 2010, l'association de l'EBMT (European Bone Marrow Transplantation) a rapporté plus de 13 000 allogreffes en 2010 (8) dans 634 centres. La progression de l'activité d'allogreffe-CSH à Nantes reflète cette évolution (Fig. 3).

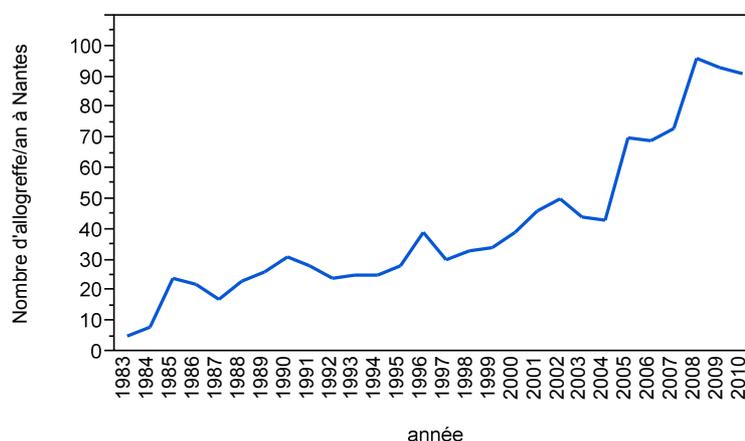


Figure 3. Evolution du nombre d'allogreffes de CSH à Nantes de 1983 à 2010

Cependant, ce traitement reste une des thérapeutiques les plus lourdes en médecine. Parmi les enjeux actuels de l'allogreffe, deux points majeurs se dégagent : la compréhension des mécanismes immunologiques de la réaction du greffon contre la tumeur afin de diminuer la rechute et celle de la réaction du greffon contre l'hôte qui reste actuellement la principale cause de morbi-mortalité liée au traitement

1.3. Les étapes de l'allogreffe

L'allogreffe de CSH peut être décrite en 4 grandes étapes :

- 1- Le conditionnement qui permet la destruction de l'hématopoïèse résiduelle et d'obtenir un état d'immunodépression de l'hôte pour éviter le rejet du greffon (Fig.4).
- 2- Transfusion des CSH correspondant traditionnellement au jour zéro J0.
- 3- La reconstitution hématologique. L'aplasie dure entre 12 et 30 jours.
- 4- La reconstitution immunologique qui peut nécessiter plusieurs mois voire plusieurs années.

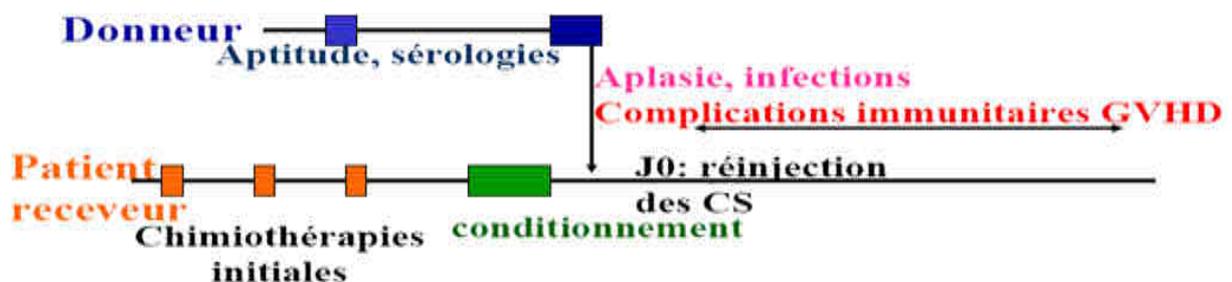


Figure 4. Etapes de l'allogreffe de CSH

1.4. Les indications

Initialement réservée aux leucémies aiguës et aplasies médullaires, les indications de l'allogreffe des CSH se sont peu à peu élargies à d'autres hémopathies malignes telles que les syndromes myélodysplasiques, certains syndromes myéloprolifératifs, les hémopathies lymphoïdes (lymphome, myélome, leucémie lymphoïde chronique...), des pathologies non malignes telles que les hémoglobinopathies (thalassémie β majeure,

drépanocytose), des déficits immunitaires, certaines maladies métaboliques (la leucodystrophie, l'ostéopétrose). La réalisation d'allogreffes de CSH dans la prise en charge des tumeurs solides est rare et encore à l'état de recherche (57 cas en 2010). Les principales indications d'allogreffe de CSH établies sont les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) de pronostic intermédiaire et défavorable en première rémission complète (RC1), les LAM en RC2 et RC3, les leucémies aiguës lymphoblastiques de haut risque en RC1, la myélofibrose primaire ou secondaire, les aplasies médullaires selon l'âge et la réponse au traitement et les syndromes myélodysplasiques de risque élevé. Ces indications dépendent de l'âge et des co-morbidités du patient et de la disponibilité d'un greffon (39).

Les indications évoluent en fonction des évaluations de l'efficacité et de la toxicité de l'allogreffe, de l'arrivée de nouvelles thérapeutiques ciblées et du progrès de la biologie (en particulier la cytogénétique, la biologie moléculaire et la cytométrie en flux) (Fig 5 et 6).

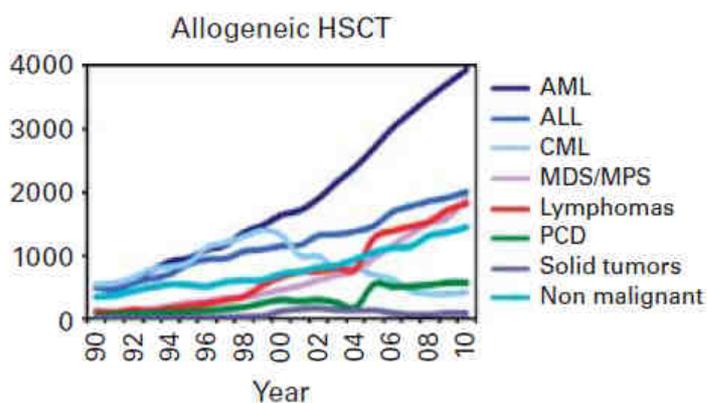
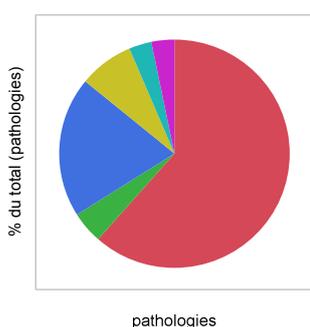
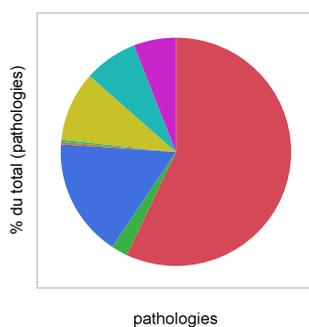


Figure 5. Evolution des indications d'allogreffes selon les pathologies
rapport de l'EBMT (8)



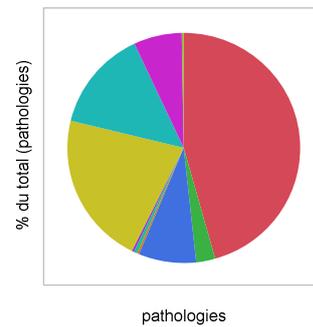
pathologies

Diagrammes et graphiques pour période=1983-1990



pathologies

Diagrammes et graphiques pour période=1991-2000



pathologies

Diagrammes et graphiques pour période=2001-2011

pathologies

Acute leukaemia[1]	Bone marrow failure[7]	Chronic leukaemia[2]	Hemoglobinopathies[11]
Histiocytic disorders[9]	Inherited disorders[8]	Lymphoma[3]	MDS/MPN[6]
Plasma cell disorders[4]	Solid tumours[5]		

Figure 6. Evolution des indications d'allogreffe selon les pathologies de 1983 à 2011 dans le Service d'hématologie de Nantes

1.5. Les sources de greffon

Il existe 3 sources de greffon possibles (Fig. 7) :

- La moelle osseuse prélevée sous anesthésie générale
- Les cellules souches périphériques. A l'état normal, en dehors de toute stimulation, la concentration sanguine en progéniteurs hématopoïétiques est extrêmement faible, ne permettant pas un recueil suffisant. Certains facteurs de croissance ou chimiothérapies permettent de mobiliser ces cellules souches médullaires dans le sang périphérique.
- Le sang de cordon ombilical

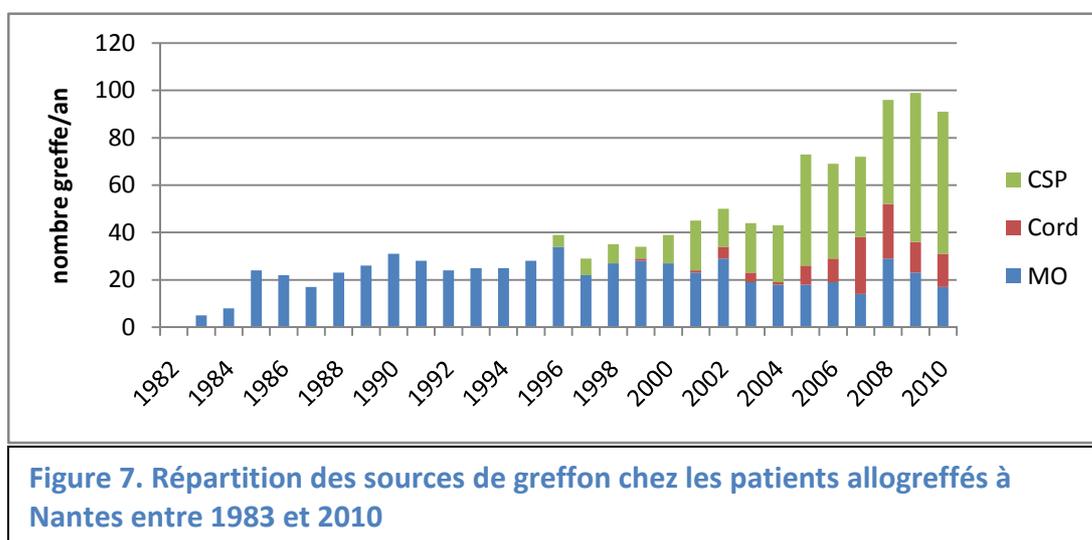


Figure 7. Répartition des sources de greffon chez les patients allogreffés à Nantes entre 1983 et 2010

1.6. Choix du donneur

Le choix du greffon se fait en premier lieu sur la compatibilité des systèmes HLA du donneur et du receveur. Le système HLA regroupe un ensemble de plus de 200 gènes regroupés sur une région du bras court du chromosome 6 et qui, pour un certain nombre d'entre eux, sont impliqués dans la réponse immunitaire. Cette région est divisée en 3 parties, appelées HLA de classe I, II et III (40). Les gènes du système HLA ont pour caractéristique commune d'être particulièrement polymorphes, exprimés de façon co-dominante et transmis à la descendance par haplotype complet.

Le système HLA de classe I est constitué d'une vingtaine de gènes. Il est exprimé par la majorité des cellules nucléées de l'organisme et par les plaquettes. Seuls les loci A, B et C sont véritablement impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire. La

fonction essentielle de ces molécules HLA classe I est de présenter en surface les antigènes provenant des pathogènes qui se répliquent dans le cytoplasme. Ces antigènes sont alors reconnus par les cellules T cytotoxiques CD8+. Le système HLA de classe II est exprimé par les cellules présentatrices d'antigène, principalement les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés. Les principaux loci sont DR, DQ et DP. Les molécules HLA classe II lient les peptides dérivés d'antigènes internalisés dans les compartiments endosomiques de la cellule. Ces antigènes sont alors reconnus par les lymphocytes T auxiliaires naïfs dans l'étape initiale des réponses immunitaires. Les lymphocytes T du receveur peuvent reconnaître les antigènes du donneur et provoquer un rejet de greffe. A l'inverse, les lymphocytes du donneur peuvent reconnaître les antigènes du receveur et entraîner une GvH.

La sélection du donneur est donc capitale dans la réussite d'une greffe de CSH. On peut définir:

1.6.1. Les donneurs vivants

- Les donneurs apparentés:
 - Génoidentiques: correspondant aux frères et soeurs avec une compatibilité HLA 10/10.
 - Haplo-identiques : correspondant aux parents ou aux « demi-frère ou sœur », le patient et le donneur sont donc semi-compatibles
- Non-apparentés : Dans 70% des cas, un donneur intra familial n'existe pas, si bien qu'un donneur extra-familial doit être recherché dans une base mondiale de données appelée Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW). Le greffon est prélevé chez un volontaire sain, inscrit sur un fichier. Le fichier international compte à présent plus de 18 millions de donneurs. Les chances de trouver un donneur sont de 30 à 40 %. En fait, il existe un déséquilibre de liaison des antigènes HLA dans la population qui rend la distribution des chances peu homogène. Pour certains patients on admet un certain degré d'incompatibilité (mismatch) HLA 9/10.

1.6.2. Le sang de cordons placentaires

Pour les greffes de sang placentaire on admet 2 à 3 incompatibilités.

Après la compatibilité HLA, d'autres facteurs rentrent en compte dans le choix du donneur tels que la richesse du greffon pour les unités de sang placentaires, le statut sérologique pour le cytomégalo virus, l'âge du donneur, le sexe du donneur (en évitant les donneurs féminins et allo-immunisés) et le groupe sanguin ABO rhésus.

1.7. Le conditionnement

Il existe deux grands types de conditionnement en allogreffe de CSH : le conditionnement myéloablatif et le conditionnement d'intensité réduite (38;39;40).

1.7.1. Le conditionnement myéloablatif :

Le conditionnement dit myéloablatif conventionnel consiste à détruire, dans un premier temps, les cellules tumorales du receveur par une chimiothérapie et/ou une radiothérapie à forte intensité avant d'injecter les cellules souches saines d'un donneur. On a donc un effet myéloablatif et immunosuppresseur. La toxicité de ce type de conditionnement est importante (mucite, aplasie prolongée, maladie veino-occlusive...) rendant ce traitement inadapté aux personnes de plus de 50-55 ans et/ou ayant des comorbidités.

1.7.2. Le conditionnement d'intensité réduite :

Réduire l'intensité du conditionnement a pour principal objectif de diminuer la toxicité et donc la mortalité liées à la greffe ; l'effet anti-tumoral repose alors moins sur le conditionnement que sur l'effet GvL. Le conditionnement n'étant pas totalement myéloablatif, les cellules hématopoïétiques du receveur et du donneur cohabitent initialement, créant un chimérisme hématopoïétique. Il est maintenant bien démontré qu'un chimérisme mixte qui persiste est associé à une augmentation du risque de rechute chez les patients greffés. Il doit être converti en chimérisme complet du donneur, notamment par l'injection de lymphocytes du donneur (DLI) afin favoriser l'effet GvL.

Ces trois caractéristiques, à savoir la faible toxicité du conditionnement, la présence d'un chimérisme mixte transitoire et la myélo-suppression transitoire définissent les conditionnements à intensité réduite. Cette procédure a montré une réduction considérable de la morbidité à court terme et de la mortalité non liée à la rechute

rendant cette thérapeutique accessible à des patients qui ne pouvaient en bénéficier auparavant.

1.8. Réaction du greffon contre la leucémie ou contre la tumeur (GvL ou GvT)

Outre les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules immunitaires impliquées dans l'effet GvL sont principalement les lymphocytes T CD4 et CD8 et les cellules NK. Les antigènes cibles sont principalement les antigènes mineurs d'histocompatibilité, et les peptides polymorphiques présentés par les molécules HLA des cellules du receveur. L'immunogénicité des antigènes mineurs d'histocompatibilité résulte le plus souvent d'un polymorphisme d'un ou de quelques nucléotides dans les gènes homologues du donneur ou du receveur (41). Lorsque les lymphocytes T du donneur réagissent contre un antigène mineur d'histocompatibilité du receveur largement exprimé tant sur ses cellules hématopoïétiques que sur les cellules endothéliales, ils causent non seulement un effet de la greffe contre la tumeur mais également une GvH. En revanche, lorsque les lymphocytes T réagissent contre un antigène mineur d'histocompatibilité exprimé uniquement à la surface des cellules hématopoïétiques du receveur, ils induisent un effet de la greffe contre la tumeur, particulièrement dans le cadre des greffes haploidentiques chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë dont les cellules n'exprimaient pas la molécule HLA-C nécessaire à l'engagement du récepteur inhibiteur (Killer Inhibitory Receptor [KIR]) des cellules NK du donneur. La production d'anticorps par les lymphocytes B a également été associée à un effet de la greffe contre la tumeur. Plus spécifiquement, la présence d'anticorps contre des gènes exprimés par le chromosome Y chez des patients masculins ayant reçu une greffe d'un donneur féminin est associée à une diminution du risque de rechute et à une augmentation du risque de GvH chronique (42).

1.9. Complications

1.9.1. Complications infectieuses

Trois phases d'immunodépression entraînent une vulnérabilité spécifique vis-à-vis d'agents infectieux (43).

La première phase correspond à la période de neutropénie (polynucléaires neutrophiles inférieurs à $0,5 \cdot 10^9/L$) précédant la prise de greffe. Sa durée varie considérablement selon le type de conditionnement. Pendant cette période, le patient présente un déficit des fonctions phagocytaires. Il en résulte une susceptibilité accrue vis-à-vis des bactéries (bacilles gram négatif et cocci gram positif) et des champignons (en particulier *Aspergillus*) présents dans la flore du tube digestif, sur la peau ou de l'environnement du patient.

La deuxième phase survient après la prise de greffe et se poursuit les 3 premiers mois. Les fonctions phagocytaires sont restaurées mais il existe un déficit de l'immunité à médiation cellulaire, qui peut être accru par la survenue de GVH. Cette immunodépression entraîne une sensibilité particulière vis-à-vis des virus, en particulier le cytomégalovirus (CMV). Les infections à *Aspergillus* ou *Pneumocystis jiroveci* sont également fréquentes pendant cette période en l'absence de prophylaxie.

La troisième phase survient après le troisième mois. Il existe un déficit de l'immunité cellulaire et humorale pouvant être exacerbé par une GvH chronique. Le CMV, le virus varicelle-zona, les virus respiratoires, l'Epstein-Barr Virus (EBV) -responsable du syndrome lymphoprolifératif post-transplantation lié à l'EBV- et les germes encapsulés sont autant de germes potentiellement pathogènes pour le patient allogreffé.

1.9.2. Complications liées à la toxicité du traitement

- Complications d'origine endothéliale

La maladie veino-occlusive également appelée syndrome d'obstruction sinusoidale du foie se présente cliniquement sous la forme d'un ictère et d'une hépatomégalie douloureuse et d'une rétention hydro-sodée avec prise de poids. Sur le plan anatomo-pathologique, l'événement initiateur correspond à une altération de l'épithélium des sinusoides hépatiques par la chimiothérapie (alkylants principalement) (44). Des événements thrombotiques puis une occlusion des ces sinusoides peuvent aboutir à une hypertension portale. Cette complication survient entre 8 et 14% des cas avec un conditionnement myéloablatif et dans moins de 2% des cas avec un conditionnement atténué (45) .

La microangiopathie thrombotique liée à l'allogreffe de CSH, la pneumopathie interstitielle diffuse

- Complications au long terme : cancers secondaires, cataracte, stérilité

1.9.3. Les conflits immunologiques

1.9.3.1. Le rejet :

La prise de greffe est définie comme le premier des trois jours consécutifs au cours desquels le taux de polynucléaires neutrophiles est supérieur ou égal à $0,5 \cdot 10^9/L$. Le rejet de greffe est soit primaire soit secondaire après une prise de greffe initiale. Le rejet de greffe primaire est classiquement défini par une absence de prise de greffe 42 jours suivant la transplantation. Cette complication est rare. Les principaux facteurs de risque sont la faible richesse du greffon, les disparités HLA entre donneur et receveur, la présence chez le receveur d'un anticorps anti-HLA dirigé contre un antigène HLA présent chez le donneur, les greffes de ficher ou de sang de cordon, les greffes T-déplétées ainsi que les infections virales.

1.9.3.2. La maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

Elle correspond à une agression des organes du receveur par le système immunitaire et particulièrement les lymphocytes T du donneur. Fréquente, elle est à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité non négligeables. Son mécanisme d'action et sa présentation clinique sont différents selon son caractère aigu ou chronique.

La GVH aiguë a été définie historiquement comme celle survenant classiquement dans les 100 premiers jours suivant l'allogreffe. Elle se produit chez 30 à 50 % des patients allogreffés. Les organes les plus souvent atteints sont la peau, le tube digestif et le foie. Au stade initial, la GVH aiguë cutanée touche avec prédilection les faces palmaires des mains et des pieds. L'atteinte cutanée se présente sous la forme d'un rash cutané pouvant évoluer vers des bulles dans les formes les plus sévères. L'atteinte digestive comprend des nausées, des douleurs abdominales, une diarrhée aqueuse voire des rectorragies. La GVH aiguë hépatique se manifeste par une cholestase. La sévérité de l'atteinte de la GVH aiguë se cote du grade I pour les formes les plus légères au grade IV pour les formes les plus sévères. Un modèle de physiopathologie de la GVH impliquant trois étapes a été proposé par Reddy et Ferrara (46) :

- une activation tissulaire due au conditionnement induit une production transitoire de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α) qui augmentent l'immunogénicité des cellules de l'hôte;
- les lymphocytes T alloréactifs du donneur, administrés avec le greffon, sont alors activés et sécrètent des cytokines de type 1, telles qu'IL-2, TNF- α et IFN- γ ;
- ces cytokines activent secondairement les cellules effectrices responsables des lésions de la GvH (lymphocytes T cytotoxiques, cellules NK, macrophages...). Ce modèle accorde un rôle prépondérant aux cellules T du greffon, mais également aux cytokines.

La prévention de la GvH est primordiale et repose sur les immunosuppresseurs. Le méthotrexate fut la première molécule employée à cet effet. La ciclosporine a été utilisée à partir des années 1980. Le tacrolimus, le sirolimus, le mycophénolate mofétil peuvent être administrés dans cette indication. La déplétion T du greffon permet de diminuer le risque de GVH au prix d'un taux de rechute important.

La prise en charge thérapeutique de la GVH repose initialement sur la corticothérapie. En cas d'échec, le pronostic devient particulièrement réservé.

Partie 2 : La maladie chronique du greffon contre l'hôte et cytokines

2.1. La maladie chronique du greffon contre l'hôte (GVH chronique)

2.1.1 Définition et épidémiologie

La GVH chronique est une pathologie de type allo-immun, secondaire à la reconnaissance de certains antigènes du receveur par les cellules immunocompétentes du donneur. Elle survient chez 40 à 70% des patients après allogreffe de CSH dont elle représente la principale complication à moyen et court terme. (11, 12). Malgré l'effet anti-tumoral associé, elle est la source d'une morbidité importante, soit par elle-même avec une détérioration de la qualité de vie, soit par les complications- notamment infectieuses- chroniques ou secondaires au traitement de la GVH. Elle survient en médiane entre 4 et 6 mois post-allogreffe. La majorité des cas sont décrits dans la première année. Alors que l'utilisation prophylactique de multiples traitements immunosuppresseurs a permis de réduire l'incidence et la sévérité de la GVH aiguë,

l'incidence de la GVH chronique est susceptible d'augmenter dans les années à venir en raison de la réalisation des allogreffes chez des patients plus âgés ayant des maladies avancées. Cet accroissement prévisible d'incidence est directement lié à l'introduction, depuis près d'une décennie, des conditionnements d'intensité réduite et à l'augmentation des infusions des lymphocytes du donneur dans ce type de conditionnement.

La GVH chronique et son état d'immunodépression associé sont les principales causes de mortalité non liée à la rechute (NRM) chez les patients long-survivant après allogreffe. Une large étude de registre a montré que les patients allogreffés pour leucémies aiguës myéloblastiques et présentant une GVH chronique avaient avec 3 fois plus de risque de NRM que ceux ne présentant pas de GVH chronique (14). La première cause de décès liée à la GVH chronique est l'infection.

De nombreuses études ont montré l'association entre la présence d'une GVH chronique et un indice de Karnofsky diminué, une qualité de vie altérée et un retour au travail plus tardif (15).

2.1.2.1. Facteurs de risque et prévention

Les facteurs de risque de GVH chronique établis sont l'âge du patient (un patient âgé a plus de risque de développer une GVH chronique qu'un patient jeune), un antécédent de GVH aiguë, un donneur de sexe féminin avec un receveur de sexe masculin, l'existence d'une incompatibilité HLA, un donneur non-apparenté, l'infusion de lymphocytes du donneur, l'utilisation de CSP mobilisées par G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) (en comparaison à la moelle osseuse) comme source du greffon (47-51). D'autres facteurs de risque impliqués dans la GVH chronique sont plus controversés tels que la sérologie CMV positive, un greffon riche en CD34+, l'antécédent de splénectomie (52). Par ailleurs, les allogreffes de CSH avec sang de cordon sont moins à risque de développer une GVH chronique.

Du point de vue immunologique, la GVH chronique est associée à un effet greffon contre tumeur (GvT) concernant les pathologies malignes. Cependant, l'intensité de la GVH chronique n'est pas corrélée à son effet GvT (53). Les approches préemptives n'ont pas permis de diminuer l'incidence de la GVH chronique (54). Une autre stratégie a été de sélectionner les populations à haut risque de développer une GVH chronique sévère. L'addition de sérum anti-lymphocytaire à la ciclosporine et au méthotrexate a

permis de façon significative de diminuer de façon significative le risque de GVH chronique extensive et de GVH chronique pulmonaire , de diminuer la mortalité non liée à la rechute (NRM) et d'améliorer la qualité de vie des patients allogreffés avec un donneur non-apparenté (55, 56) .

2.1.2.2. Symptômes cliniques et biologiques de la GVH chronique

Les différents symptômes de la GVH chronique sont présentés dans le tableau I. La GVH chronique présente des similarités avec des maladies auto-immunes telles que la sclérodermie, le lupus érythémateux, le syndrome de Sjögren, la polyarthrite rhumatoïde, le lichen plan, la bronchiolite oblitérante ou encore la cirrhose biliaire primitive.

Les manifestations cliniques de la GVH chronique les plus fréquemment observées sont les atteintes cutanées (65 à 80%) (Fig. 8 A et B), buccales (48-72%), hépatiques (40-73%) et oculaires (18-47%) (Tableau I). La médiane de survenue de la GVH chronique est de 6 mois après la greffe et la majorité des cas se déclarent dans les 2 ans. La prévalence de la GVH chronique commence à diminuer à partir de 2-3 ans. Cependant, près de 20% des patients présentant des symptômes de GVH chronique nécessitent un traitement immunosuppresseur jusqu'à 5 ans après la greffe (57). Par ailleurs, même si une partie des patients ne présente plus de symptômes après traitement, il reste un groupe de patients chez qui persistent des séquelles de GVH chronique altérant la qualité de vie (syndrome sec, bronchiolite oblitérante...).

Tableau I. Symptômes cliniques de la GVH chronique selon critères du NIH (3)

Organe atteint	Symptôme diagnostique (suffisant à l'établissement du diagnostic GVHc)	Symptôme distinctif (seul insuffisant à l'établissement du diagnostic GVHc)	Autres signes (pouvant intégrer les symptômes de la GVHc si le diagnostic est confirmé)	Symptômes communs à la GVHa et à la GVHc
Peau	Poïkilodermie Lichen plan Aspect sclérotique Morphée Lichen scléreux	Dépigmentation	Troubles de la sudation Icthyose Hypo/hyper pigmentation	Erythème Rash maculopapulaire Prurit
Ongle		Dystrophie Onycholyse Pterygium Perte d'un ou plusieurs ongles		
Cuir chevelu et pilosité		Alopécie séquellaire Lésions papulo-squameuse	Apparition prématurée de cheveux gris Modification nature des cheveux	
Bouche	Lichen Limitation de l'ouverture de la bouche par atteinte sclérotique	Xérostomie Mucocèle Atrophie de la muqueuse Pseudomembranes Ulcère		Gingivite Mucite Erythème Douleur
yeux		Syndrome sec Conjonctivite cicatricielle Kératoconjonctivite	Photophobie Hyperpigmentation péri-orbitaire blépharite	
Organes génitaux	Lichen plan Sténose vaginale	Erosions Fissures Lésions ulcéreuses		
Atteinte digestive	Anneaux et membranes oesophagiens		Insuffisance pancréatique exocrine	Anorexie, Nausée, Vomissement Diarrhée, perte de poids Atteinte de la croissance (enfant)
Foie				Dosage de la bilirubine totale des phosphatases alcalines ou ALAT, ASAT > 2 les normales
Poumons	Bronchiolite oblitérante (diagnostic histologique)	Bronchiolite oblitérante (diagnostic radiologique et test des fonctions pulmonaires)		

Muscles	Fasciite	Myosite et polymyosite	Oedème	
Fascia, Articulations	Raideur articulaire Contractures secondaires à la sclérose		Arthralgie, arthrite Crampes musculaires	
Système hématopoïétique			Thrombopénie Eosinophilie Lymphopénie Hypo ou hypergammaglobulinémie Auto-anticorps (AHA1, PTI)	
Autres			Epanchement pleural, péricardique Neuropathie périphérique Syndrome néphrotique Myasthénie Anomalies de la conduction cardiaque et cardiomyopathie	



Figure 8 A et B. Atteinte épidermique de la GVH chronique.

(A) type lichen-plan. (B) Atteinte cutanée scléreuse donnant un aspect rigide des mollets en « tige de pipe » et réduisant la mobilité articulaire des chevilles, lésions érosives avec une mauvaise cicatrisation(B) (5, 6)

2.1.3. Mode et chronologie de survenue

La GVH chronique survient classiquement au-delà de 100 jours après la transplantation. Cependant, ces manifestations chroniques peuvent survenir plus précocement ; inversement, des symptômes de GVH aiguë peuvent survenir au-delà de ce délai, notamment après réinjection de lymphocytes de donneur. En 2005, la

conférence de consensus du NIH (National Institute of Health) a proposé que la définition de la GVH aiguë ou chronique soit fondée sur le type de manifestations cliniques plutôt que sur le moment de survenue par rapport à la greffe (Tableau III) (3). Ainsi, à côté des GVH aiguës et chroniques classiques survenant dans les délais habituels avec des signes cliniques de type purement aigu ou chronique, certains patients présentent des GVH aiguës tardives, récidivantes, persistantes, et d'autres associent des signes de GVH chronique et aiguë, ce qui correspond à des formes de chevauchement.

La GVH peut apparaître de novo sans GVH aiguë préalable; elle est dite « quiescente » lorsqu'elle fait suite à une GVH aiguë après un intervalle libre, ou encore « progressive » si elle succède à une GVH aiguë sans intervalle libre, cette dernière étant de plus mauvais pronostic (58).

Category	Time of Symptoms after HCT or DLI	Presence of Acute GVHD Features ^a	Presence of Chronic GVHD Features ^a
Acute GVHD			
Classic acute GVHD	≤100 d	Yes	No
Persistent, recurrent, or late-onset acute GVHD	>100 d	Yes	No
Chronic GVHD			
Classic chronic GVHD	No time limit	No	Yes
Overlap syndrome	No time limit	Yes	Yes

GVHD indicates graft-versus-host disease; HCT, hematopoietic cell transplantation; DLI, donor lymphocyte infusion.

Tableau II. Classification de la GVH aiguë et chronique selon Filipovich et coll.(3)

2.1.4. Critères diagnostiques et de sévérité de la GVH chronique

Le diagnostic de GvH chronique est essentiellement clinique. A partir des manifestations cliniques classiques, la conférence de consensus a proposé que le diagnostic soit désormais fondé principalement sur la présentation clinique avec des critères standardisés classés en critères diagnostiques ou en « manifestation distinctives », ces dernières nécessitant une confirmation paraclinique, notamment histologique.

Outre le diagnostic, l'évaluation de la sévérité de la GvH chronique est une étape importante, car elle oriente la décision thérapeutique et sert de référence pour le suivi de la réponse au traitement.

Une des premières classifications de GVH chronique a été proposée par l'équipe de Seattle en 1980 (1). Elle portait sur des critères cliniques, biologiques et histologiques étudiés chez 20 patients allogreffés. Ces patients avaient reçu un conditionnement myéloablatif, avec comme source du greffon de la moelle osseuse d'un donneur génétiquement identique. La GVH chronique était alors classifiée en limitée et extensive tableau (Tableau II).

Limited chronic GVHD

Either or both:

1. Localized skin involvement
2. Hepatic dysfunction due to chronic GVHD

Extensive chronic GVHD

Either:

1. Generalized skin involvement; or
 2. Localized skin involvement and/or hepatic dysfunction due to chronic GVSD, plus:
 - a. Liver histology showing chronic aggressive hepatitis, bridging necrosis or cirrhosis; or
 - b. Involvement of eye: Schirmer's test with less than 5 mm wetting; or
 - c. Involvement of minor salivary glands or oral mucosa demonstrated on labial biopsy; or
 - d. Involvement of any other target organ.
-

Tableau III. Classification de la GVH selon Shulman et coll. (1)

Des facteurs pronostiques ont été identifiés, tels que l'extension initiale cutanée (>50% de la surface corporelle), facteur pronostique le plus fort devant l'existence d'une thrombopénie et le caractère progressif de la GvH chronique.

Un score de sévérité plus précis a été récemment proposé. A partir d'une gradation (de 0 à 3) de l'atteinte organique est établie la sévérité de la GVH chronique. Celle-ci est divisée en 3 groupes : la GVH légère, modérée et sévère. Alors qu'une GVH légère entraîne un traitement local, les GVH chroniques modérées et sévères conduisent à la mise en place d'un traitement systémique. Ce score relativement complexe nécessite toutefois, pour être documenté de manière précise, une expertise multidisciplinaire. Cependant, même si ce score est utilisé et validé dans des études prospectives, il reste rarement appliqué en pratique clinique (59).

2.1.5. GVH chronique et atteinte du système immunitaire

La reconstitution immunitaire joue un rôle majeur dans le devenir de l'allogreffe. Plusieurs paramètres tels que l'âge du receveur, la source du greffon, le type de conditionnement influencent la reconstitution du système immunitaire. Néanmoins, la GVH chronique et l'introduction de traitements immunosuppresseurs qui en découle affectent aussi bien l'immunité innée que l'immunité adaptative. Cependant, les long-survivants ayant développé une GVH chronique sévère sont capables de retrouver des fonctions immunitaires normales. La persistance d'une lymphopénie B, une inversion du rapport CD4/CD8 et une diminution de synthèse des immunoglobulines (Ig) sont des facteurs de risque associés aux infections tardives (60). La fonction thymique après allogreffe est très probablement un facteur majeur dans la reconstitution du système immunitaire (61). Le nombre de lymphocytes B diminue pendant les 12 premiers mois, les taux d'immunoglobulines (Ig) chutent les premiers mois pour remonter ultérieurement (en termes de mois pour les IgG et IgM et d'années pour les IgA). Ces évolutions reflètent probablement l'ontogénèse B par l'incapacité des cellules B en post-allogreffe à réagir avec les cellules T afin d'intervenir dans la commutation isotypique (62). Les différents facteurs contribuant à l'immunodéficience dans le cadre de la GVH chronique sont résumés dans le tableau IV.

	Conséquences
Atteinte de la fonction thymique	Diminution de production des cellules T naïves Dysfonction des cellules T helper → impact sur l'ontogénèse B
Traitement immunosuppresseur prolongé (corticothérapie haute dose, ciclosporine, mycophénolate mofétil...)	Lymphopénie Atteinte de l'immunité cellulaire (diminution des lymphocytes CD4+) Atteinte de l'immunité humorale (diminution des lymphocytes B, du taux IgG et d'IgA) Réduction du mécanisme d'opsonisation Dysfonctions des cellules dendritiques (capture de l'antigène, présentation)

Tableau IV. Facteurs contribuant à l'immunodéficience et aux risques d'infections opportunistes dans un contexte de GVH chronique (7)

2.1.6. GVH chronique et infections

Le risque infectieux chez le patient allogreffé et atteint d'une GVH chronique reste un problème majeur. Il existe une sensibilité aux bactéries encapsulées. Les infections fongiques et infections ou réactivations virales restent très fréquentes chez les patients ayant une GVH chronique active sous traitement immunosuppresseur. Les pneumocystoses et les toxoplasmoses tardives restent une complication fréquente. Ainsi la prophylaxie par le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Bactrim®) doit être maintenue plusieurs mois après l'arrêt du traitement immunosuppresseur.

2.1.7. Traitements

Une forme limitée de GVH chronique nécessite un traitement local évitant ainsi de majorer l'immunodépression. Dans le cas d'une atteinte extensive, modérée à sévère, il est nécessaire de débiter un traitement systémique et d'évaluer la réponse au traitement. La plupart des patients doivent poursuivre un traitement immunosuppresseur pendant un an, et plus de la moitié des patients sont encore sous traitement après 2 ans. Alors que la moitié des patients répond au traitement de première, la GvH chronique réfractaire (cortico-résistante) reste associée à une morbidité et une mortalité très importante. Tandis que le traitement de 1^{ère} ligne de la GVH chronique, relativement standardisée, se réfère à des études prospectives randomisées, le traitement de 2^{ème} ligne est souvent fondé sur des études de phase II et des études rétrospectives avec des critères de diagnostic et d'évaluation de la sévérité pouvant être différents.

- 1^{ère} ligne de traitement

La corticothérapie à 1mg/kg/j associée à la ciclosporine constitue le traitement standard de la GVH chronique. Ce traitement doit être diminué de façon très progressive après 2 semaines d'amélioration (63). Une GVH chronique est considérée cortico-résistante s'il y a une progression des symptômes sous au moins 1mg/kg/j de prednisone, ou une stabilité de la GVH au-delà de 4 semaines sous au moins 0,5mg/kg/j de prednisone ou une impossibilité de diminuer la corticothérapie en dessous de 0,5mg/kg/j nécessitant l'institution d'un traitement de 2^{ème} ligne.

- 2^{ème} ligne de traitement

Il n'y a pas de standard de traitement pour les GVH chroniques réfractaires. La relative faiblesse des effectifs jointe des critères d'inclusion et d'évaluation rendent difficile la comparaison entre les études. Les principaux traitements sont :

- Les corticoïdes en bolus : Bien que la corticothérapie à forte dose en bolus soit fréquemment utilisée, notamment en pédiatrie, une seule étude a évalué son efficacité (64). Une réponse majeure a été observée chez 48% des patients. Cependant, ce traitement ne fait pas l'unanimité en raison des effets secondaires des corticoïdes à forte dose
- La photochimiothérapie extra-corporelle dont le mécanisme est assez complexe donne de meilleurs résultats sur la peau, le foie et les muqueuses (65) .
- Le mycophénolate mofétil est de plus en plus utilisé dans le traitement de rattrapage de la GVH chronique réfractaire. Il n'a pas été évalué dans une étude prospective.
- Le rituximab, anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, agissant donc sur la composante humorale de la GVH, est une option thérapeutique dans les formes sclérodermiques ou lichénoïdes.
- Les inhibiteurs de tyrosine kinase en inhibant les voies de signalisation PDGFR et TGF- β pourraient représenter une alternative sérieuse pour le traitement de 2^{ème} ligne de la GVH chronique, notamment sclérodermiforme.

2.2. Les cytokines

2.2.1. Définition

La réponse immunitaire est la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types cellulaires qui communiquent entre eux via :

- des molécules de surface impliquant un système ligand-récepteur
- des médiateurs solubles : cytokines et chémokines

Les cytokines sont des glycoprotéines synthétisées en réponse à une activation spécifique ou non spécifique. De nombreuses cytokines solubles sont connues sous le nom d'interleukines, terme qui fait référence à la découverte des cytokines comme des molécules médiatrices de signal produites par et agissant sur des leucocytes. On sait à présent que cette vision des choses est trop restrictive et que des cytokines peuvent être sécrétées par des cellules autres qu'immunitaires ou agir sur des cellules autres qu'hématopoïétiques. On estime au moins à 100 le nombre de cytokines actives dans le système immunitaire. Beaucoup d'entre elles agissent sur plusieurs cellules cibles avec des effets multiples : leur action est pléiotrope. Inversement, une cellule particulière peut répondre de façon identique aux signaux de cytokines différentes (redondance). Le caractère pléiotrope et redondant des cytokines a fait de l'élucidation de leur fonctions biologiques un défi en immunologie.

2.2.2. Classification des cytokines

2.2.2.1. *Les grandes familles de cytokines*

Les familles de cytokines sont généralement classées par rapport à leur mode d'action et leur structure :

- **Interleukines (IL)**

Il s'agit de cytokines regroupées sous cette terminologie sans parenté biochimique ni de fonction, mais classées par commodité au gré des découvertes. Le terme a été créé en 1979 à une époque où l'on ne connaissait que deux interleukines (IL-1 et IL-2). On compte aujourd'hui 35 cytokines sous l'intitulé IL-. Il en existe cependant davantage, puisqu'on compte par exemple 11 membres de la famille de l'IL-1.

○ IL-2 et son récepteur IL-2R interviennent principalement dans la différenciation des lymphocytes T effecteurs (T_H) et dans le développement des lymphocytes T régulateurs (T reg) naturels et inductibles. Ces deux fonctions sont déterminées par un niveau différent de sécrétion. IL-2 (à dose élevée) est utilisée pour activer l'immunité dans certains cancers et chez des patients atteints du SIDA ou pour son action tolérogène (à plus faible dose) pour éviter le rejet en transplantation ou dans des maladies auto-immunes (66). Le but de cette immunothérapie est donc de restituer une balance entre les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes T

régulateurs. Récemment, Koreth et coll. ont montré, chez 23 patients atteints de GVH chronique extensive cortico-résistante, que l'injection quotidienne à faible dose d'IL-2 avait permis l'obtention d'une amélioration clinique de leur GVH chez la moitié des patients. Ces réponses étaient associées à une augmentation du nombre de T reg et du ratio T reg/T conventionnel (67).

- IL-10 est considérée comme une des cytokines anti-inflammatoires majeures chez l'homme. Sécritées par diverses cellules telles que les macrophages, les lymphocytes T et B, IL-10 limite la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-1, IL-6 et IL-12, et inhibe la sécrétion des cytokines T_H1 tel que IL-2 et IFN- γ . Une des principales source d'IL-10 dans le système digestif sont les lymphocytes T reg, permettant ainsi un contrôle étroit de la stimulation chronique par la flore résidente intestinale et les antigènes provenant de la nourriture (68). Il a été montré que des mutations de cette cytokine ou de son récepteur entraînait la perte de sa fonction et était responsable d'entérocolites gravissimes chez le nouveau-né et les enfants (69). Par ailleurs quelques cas de maladies de Crohn ayant des mutations d'IL-10 ont été décrits (70).

- IL-17 : Cytokine identifiée en 1993, elle a permis d'identifier la troisième voie de lymphocytes T effecteurs : T_H17. La voie T_H17 est impliquée dans plusieurs pathologies auto-immunes ou inflammatoires dont le psoriasis, la sclérose en plaques et la maladie de Crohn (71). Récemment, plusieurs études ont montré une efficacité d'un anticorps anti-IL-17 chez des patients atteints de psoriasis (ixekizumab, brodalumab)(72, 73) et dans des cas de maladie de Crohn sévère (secukinumab) (74).

- **Chimiokines ou chémokines**

Elles correspondent à un ensemble des cytokines de faible poids moléculaires ayant toutes en commun un pouvoir chimiotactique. On en connaît plus de 40 aujourd'hui. Leur nomenclature est basée sur des points précis de leur structure (CCL1 à CCL28, CXCL1 à CXCL16, CXCL1 & 2, CX3CL1)(75).

- **Interférons (IFN)**

Ces cytokines sont classées dans 3 sous-classes qui sont l'interféron α , β et γ et appartiennent à un groupe très important dans la régulation immunitaire. L'IFN- α et l'IFN- β , regroupés sous le terme d'IFN de type I, sont les cytokines principales dans

la défense de l'organisme humain contre les infections virales. Le lien entre IFN de type I et les maladies auto-immunes est connue, bien que ses mécanismes et son rôle soient différents selon les pathologies. Ainsi, il a été montré une amélioration clinique dans le psoriasis et le lupus érythémateux disséminé en inhibant la sécrétion d'IFN de type I. Dans les pathologies où la réponse immunitaire prédominante est de type T_H1 ou T_H17 - telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou la sclérose en plaques, c'est l'administration d'IFN de type I qui améliore la symptomatologie. L'IFN- α est aussi utilisé dans le traitement de nombreuses pathologies tumorales telles que le mélanome, le sarcome de Kaposi, le cancer du rein, la leucémie myéloïde chronique, les lymphomes T.

L'IFN γ est produit par les lymphocytes T CD4 de type T_H0 et/ou T_H1 , les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et les cellules NK. Ses rôles sont variés. Il induit l'expression des antigènes HLA de classe I surtout sur les cellules qui ont un faible niveau d'expression constitutionnel et les molécules de classe II notamment sur des cellules ne l'exprimant pas de manière constitutive (lymphocytes T). Il oriente la différenciation des monocytes en macrophages. Seul ou en association avec le TNF- α , il joue un rôle essentiel dans la destruction des pathogènes intra-cellulaires au sein des macrophages.

- **Tumor Necrosis Factor (TNF)** : ce groupe comporte 2 cytokines : le TNF- α et le TNF- β . Le TNF- α est une des cytokines les plus importantes dans les processus inflammatoires.

- **Transforming Growth Factor (TGF)**: il correspond au TGF- α et au TGF- β . Le TGF- β est une des cytokines clés du maintien de la tolérance, et de la régulation, et/ou de l'arrêt des réponses immunitaires déjà engagées.

- **Facteurs stimulant les colonies** : CSF

2.2.2.2. Cytokines et polarisation des lymphocytes CD4+ effecteurs

Malgré leur caractère pléiotrope et redondant, la plupart des cytokines sont caractérisées par des fonctions particulières. Ainsi, souvent, des combinaisons de

cytokines sont produites qui agissent de façon coordonnée pour susciter des réponses immunitaires particulières.

La différenciation des cellules T est dirigée par les cellules dendritiques et les cytokines

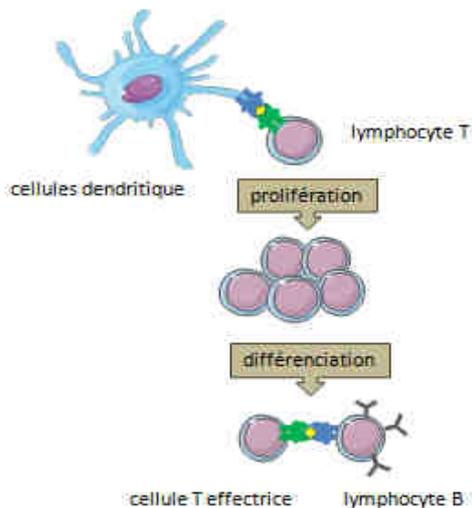
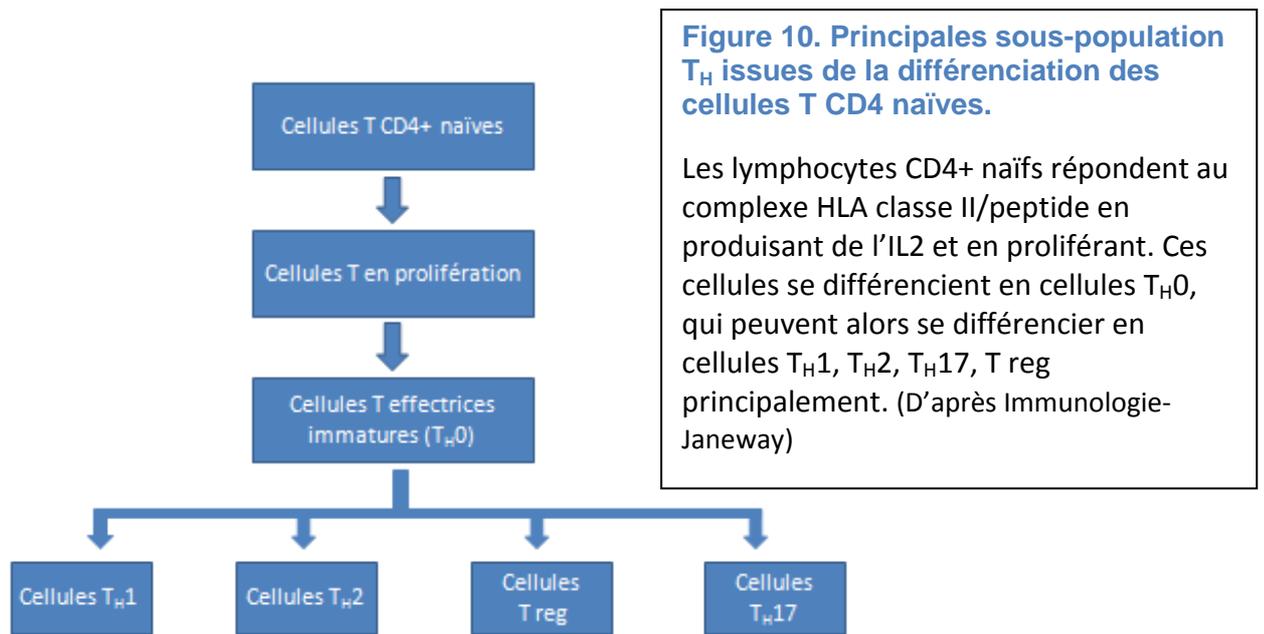


Figure 9. La différenciation des cellules T est dirigée par les cellules dendritiques et les cytokines.

Les cellules dendritiques intègrent les signaux périphériques et sont les médiatrices de la différenciation en sous-populations TH.

Les changements d'expression du profil des cytokines qui accompagnent la différenciation des lymphocytes T reflètent l'intégration de signaux donnés par les cytokines de l'environnement cellulaire et par les cellules dendritiques matures activées qui ont elles mêmes intégré les signaux de pathogènes rencontrés dans les tissus. La différenciation des cellules T est influencée par les cytokines libérées par les cellules dendritiques et par d'autres cellules immunitaires (Fig. 9).

Les cellules T CD4 se différencient en sous-populations caractérisées par des profils distincts d'expression des cytokines



Pendant l'expansion clonale, les cellules T CD4 et T CD8 se divisent toutes les 6 à 8 heures environ, et accomplissent 5 à 8 divisions. C'est pendant cette période de division cellulaire rapide que se produit la différenciation ; ainsi certains gènes de cytokines deviennent soit accessibles ou inaccessibles à des facteurs de transcription. De cette façon, des profils d'expression de cytokines distincts s'établissent dans les cellules effectrices qui peuvent être classés en différentes sous-populations de cellules T CD4 auxiliaires (T_H) ou de cellules CD8 cytotoxiques (T_C), selon le profil de cytokines qu'elles expriment (Fig. 10).

Plusieurs sous-populations T_H stables peuvent être identifiées sur la base des cytokines qu'elles produisent et qui déterminent le type d'immunité dans lequel elles interviennent. Les cytokines produites de façon prédominante sont souvent utilisées pour identifier les sous-populations. Les cellules T_{H1} , identifiables par la sécrétion d'IFN γ , coordonnent les réponses immunitaires qui facilitent la destruction de nombreux pathogènes- virus, bactéries ou protozoaires- par les cellules CD8 cytotoxiques, les cellules NK et les macrophages activés. Les cellules T_{H2} , identifiables parce qu'elles sécrètent l'IL-4, coordonnent les réponses immunitaires des éosinophiles, des basophiles et des mastocytes, qui sont spécialisés dans l'attaque des parasites pathogènes. Les cellules T_{H17} , qui sécrètent des cytokines de la famille de l'IL-17, coordonnent les réponses inflammatoires aiguës locales, dans lesquelles interviennent les neutrophiles et qui

sont dirigées contre les bactéries extracellulaires et les champignons invasifs. Les cellules T régulatrices (T reg) produisent l'IL-10 et probablement le TGF- β , et suppriment l'activation immunitaire d'autres cellules T effectrices, restreignant ainsi les réponses immunitaires excessives de l'hôte. Bien que la plupart des cellules T reg soient produites dans le thymus, des cellules T reg dotées de fonctions similaires peuvent se différencier à partir de cellules TCD4+ naïves dans les organes lymphoïdes secondaires, dans des conditions de stimulation antigénique chronique.

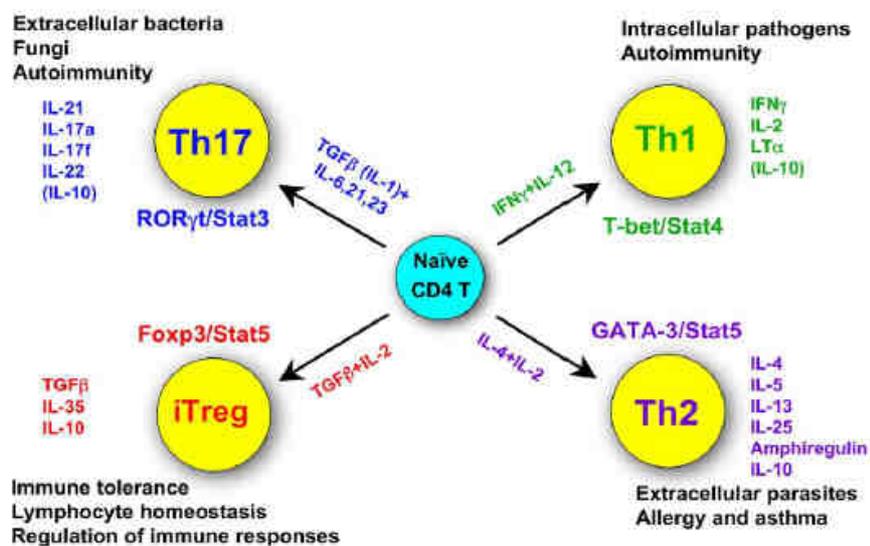


Figure 11. Différenciation des lymphocytes T en effecteur selon Zhu et coll.(2)

2.3. GVH chronique et cytokines

La GVH a été initialement décrite par Barnes, Loutit et Micklem et classiquement définie par Billingham comme un syndrome dans lequel les cellules compétents du donneur reconnaissent et attaquent les tissus du receveur immunodéprimé (26, 76). Ces critères dont les critères ont été révisés en 2006 par Sackstein et coll qui introduisent la notion de migration des cellules effectrices aux tissus cibles (4).

-
- (1) The host must be incapable of rejecting the graft
 - (2) The graft must contain immunocompetent cells
 - (3) There must be incompatibilities in transplantation antigens between donor and host
 - (4) The effector cells must migrate to the target tissues
- A Revision of Billingham's Tenets: The Central Role of Lymphocyte Migration in Acute Graft-versus-Host Disease**
-

Robert Sackstein

Tableau V. Révision des critères de Billingham portant sur le développement de la GVH selon Sackstein et coll. (4)

La GVH aiguë et la GVH chronique ont des processus physiopathologiques différents : la GVH aiguë a une composante inflammatoire importante alors que la GVH chronique a des caractéristiques de fibrose et de pathologies auto-immunes. Initialement, la GVH aiguë était décrite comme un processus impliquant des réponses T_{H1} et T_{H17} alors que la GVH chronique était plutôt considérée comme médiée par des réponses T_{H2}. Cependant, ce paradigme a été remis régulièrement en question grâce à des études portant sur des modèles murins mais aussi chez des patients allogreffés (16, 77-79). Actuellement, malgré plusieurs décennies de recherche, la physiopathologie de la GVH chronique reste peu connue. Les cellules T auto-réactives semblent importantes dans cette affection. Certaines études rapportent que le thymus n'intervient pas dans la GVH chronique et que ce sont des cellules B et T auto-réactives du donneur qui s'activent et prolifèrent pour induire une GVH chronique (80). A l'inverse, d'autres études ont montré que l'atteinte du thymus par la chimiothérapie et/ou l'irradiation et/ou la GVH aiguë était responsable d'un défaut de la tolérance du soi (81, 82).

Plusieurs études ont montré le rôle des lymphocytes B dans la GVH chronique. Ces cellules productrices d'anticorps peuvent présenter aux lymphocytes B des antigènes pouvant participer à la physiopathologie de la GVHc. D'ailleurs, certains anticorps anti-nucléaires, anti-mitochondrie, et anti-muscles lisses sont détectés chez des patients atteints de GVH chronique (83, 84). Les auto-anticorps dirigés contre le récepteur du facteur de croissance des plaquettes (PDGF) doivent très probablement participer à la GVH chronique. Ces auto-anticorps par l'activation des tyrosine-kinases contribuent au développement de l'inflammation et de la fibrose (85). Certains groupes ont montré une élévation de BAFF (B-cell activating factor de la famille du TNF) chez ces patients atteints de GVH chronique (86, 87). Ces observations expliquent très probablement

l'efficacité de l'anticorps anti-CD20 chez certains patients présentant une GVH chronique.

A ce jour, il n'a pas été étudié de facteurs prédictifs de survenue de GVH chronique. En raison de la nature immunologique de cette réaction et de l'intérêt pronostique de la précocité du traitement, il nous a paru intéressant d'étudier un panel de cytokines inflammatoires à J100 de l'allogreffe afin :

- dans un premier temps d'étudier s'il existait une corrélation entre certaines cytokines et la survenue dans le temps d'une GVH chronique,
- dans un second temps, d'établir une signature prédictive réalisable en pratique clinique et de déterminer si cette signature avait une signification pronostique.

Le pronostic d'une GVH chronique étant lié à sa gravité, nous avons focalisé notre étude sur la GVH chronique extensive.

Partie 3 - Etablissement d'un score clinico-biologique prédictif de la GVH chronique extensive

3.1. Objectifs de l'étude

- 1) Etudier s'il existe une corrélation entre la présence et les taux de cytokines inflammatoires à J100 et la survenue d'une GVH chronique extensive chez les patients allogreffés tout en prenant en compte les paramètres cliniques de la greffe
- 2) Etablir une signature clinico-biologique, à J100, qui soit prédictive de la survenue de la GVH chronique extensive, avec étude de l'éventuelle valeur pronostique de cette signature.

3.2. Patients, matériels et méthodes

3.2.1. La population étudiée

Cette étude a porté sur 152 patients ayant reçu d'une allogreffe de CSH entre 2005 et 2008 dans le service d'Hématologie au CHU de Nantes.

Les caractéristiques de la population étudiée sont décrites dans le tableau VI. L'âge médian était de 52 ans (18-70) et 55% des patients étaient de sexe masculin. Quarante-sept patients (57%) étaient traités pour des pathologies myéloïdes. Soixante-dix patients (53%) avaient un donneur géno-identique, alors que soixante (40%) patients avaient un donneur phéno-identique et 22 (14%) avaient reçu un greffon avec un mismatch-HLA. Dans 68% des cas le conditionnement était d'intensité réduite. La source du greffon était chez 108 patients des CSP (72%), de la moelle osseuse chez 28 patients (18%) et du sang de cordon placentaire dans 18 cas (12%). Le suivi médian était de 2,3 ans (0,13-4,85). Le diagnostic de GVH chronique était basé sur des critères cliniques et/ou histologiques (1, 88). Une GVH chronique était considérée extensive selon les critères classiques :

- Lésions de GVH d'au moins 2 organes, avec biopsies positives (si réalisées)
- Lésions cutanées étendues (plus de 20% de la surface cutanée), avec éventuellement biopsie cutanée positive, sclérose cutanée
- Bronchiolite oblitérante

- Anomalies du bilan hépatique et biopsie hépatique positive
- Troubles digestifs et biopsies du tractus digestif positives
- Introduction d'un traitement systémique immunosuppresseur par le clinicien

Tableau VI. Caractéristiques de la population et des paramètres de l'allogreffe de CSH

Caractéristiques	
Age médian, année (rang)	52(18-70)
Sexe Receveur, no.homme/no.femme (%h/%f) Donneur féminin, no (%)	83/69 (55/45) 68 (45)
Receveur-donneur CMV négatif, no (%)	62(41)
Diagnostique, no (%) Leucémie aiguë Lymphome Leucémie chronique SMD/SMP Myélome Aplasia médullaire	58(38) 45(30) 16(10) 17(11) 12(8) 4(3)
Statut de la maladie, no. (%) Risque standard Risque avancé	88(58) 62(42)
Conditionnement, no(%) Myéloablatif A intensité réduite	104(68) 48(32)
Prophylaxie de la GVH, no (%) Ciclosporine seule Ciclosporine + autre drogue	72(47) 73(48)
Source du greffon, no. (%) Moelle osseuse CSP Sang de cordon	28(18) 108(71) 18(12)
Richesse du greffon, médiane (rang) CD34.10 ⁶ xkg/ poids du receveur CD3.10 ⁶ xkg/ poids du receveur	5,6 (0,1-20,2) 124 (0,1-636)
Type de donneur, no. (%) Géno-identique Phéno-identique Non apparenté avec mismatch HLA	70(46) 60(40) 22(14)

GVH aiguë, no (%)	76(50)
Grade II-IV	49(32)
Grade III-IV	22(14)
GVH chronique, no (%)	70(44)
Limitée	23(15)
Extensive	47(31)

3.2.2. Echantillons et dosage de cytokines

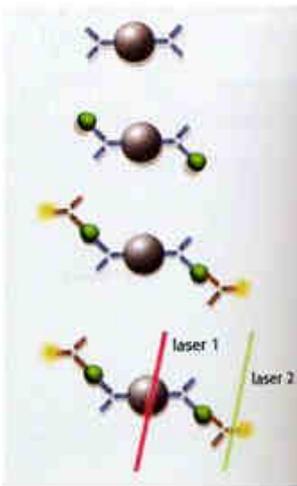
Les prélèvements sanguins étaient collectés à J100 (83-119) après l'allogreffe de CSH. Le sérum était alors obtenu après centrifugation et conservé à -80°C. Au total 41 cytokines ont été dosées sur ces échantillons sanguins. Ces cytokines ont été sélectionnées à partir de différentes études publiées ayant montré leur probable rôle dans la physiopathologie de l'allogreffe (89-96).

Les concentrations des cytokines suivantes ont été déterminées par la technologie Luminex Xmap (Millipore, St Charles, Missouri, USA) : IL-21, IL-23, TARC, TRAIL, CD40L, FLT3L, FRACTALKINE (CX3CL1), IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1a, IL1b, IL-1R α , IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP10 (CXCL10), MCP1, MCP3, , MIP-1 α (CCL3), MDC (CCL22), MIP-1 β (CCL4), PDGF AB-BB, RANTES (CCL5), TGF- α , TNF- α , TNF- β et VEGF (Fig. 12 A,B et C).

La technologie xMAP est basée sur un principe de dosage ELISA (méthode immuno-enzymatique) en microplaque 96 puits, avec comme support des microbilles de polystyrène (diamètre 5,6 μ m) identifiées par un code couleur spécifique (100 possibilités). Les microbilles étant en suspension, elles offrent donc une plus grande surface de contact que dans un système ELISA classique. Les microbilles sont colorées par deux fluorophores ayant des ratios différents. Le système optique est constitué de deux lasers, le premier (rouge 635 nm) excite dans chaque microbille xMAP le mélange de colorants qui la définit. Ceci permet d'identifier avec un code couleur chacune des molécules proposées. Le second laser (vert 532 nm) excite le fluorophore rapporteur attaché à l'anticorps spécifique de détection (phycoérythrine) permettant de quantifier la molécule par bille.

Figure 12 A, B et C. Principes de la technique multiplex

A



1. Les billes avec l'anticorps de capture

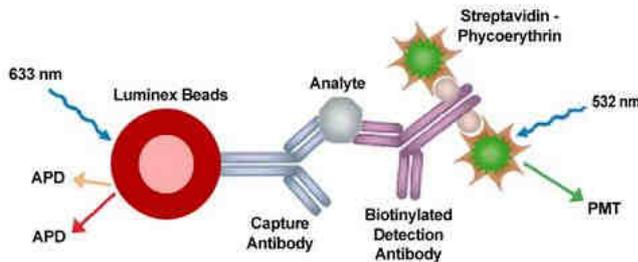
2. Les anticorps des billes lient l'analyte

3. L'anticorps biotinylé se lie à l'analyte, la streptavidine-phycoérytrine se lie à la biotine, puis émet de la fluorescence (MFI)

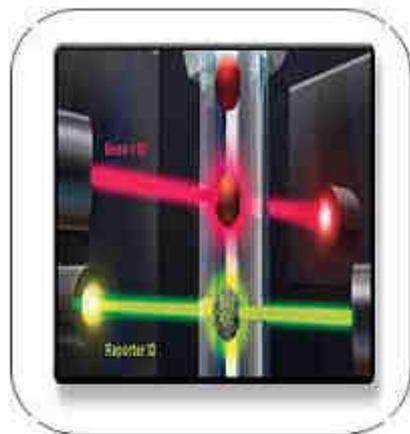
4. La fluorescence est détectée par les lasers et le photomultiplicateurs du Luminex: Le laser 1 excite le code couleur correspondant à une des 100 molécules proposées, le laser 2 permet la quantification du facteur analyser

B

Multiplex Assay Design



C



Red laser reads the bead, i.e. the target

Green laser detects the amount of the target

Les acquisitions sont réalisées par le logiciel xPonent (Luminex, St Charles, Missouri, USA). La sensibilité de la détection est située entre 0,4pg/mL et 28 pg/mL.

Le dosage de deux autres cytokines, BAFF et Elafin a été réalisé par technique ELISA selon les instructions du fabricant (RD system, Minneapolis, USA).

3.2.3. Analyses statistiques

3.2.3.1. Etude des corrélations

L'objectif principal et donc d'étudier s'il existe une relation significative entre certaines cytokines et la survenue de la GVH chronique extensive indépendamment des paramètres cliniques. Un modèle multivarié est construit (sélection univariée : $p < 0,20$, puis sélection multivariée : $p < 0,05$). Chaque cytokine significative en analyse univariée est ajustée sur ces facteurs cliniques. La validation de l'hypothèse de proportionnalité des risques est réalisée à l'aide du test des résidus de Gamsch and Therneau (97).

3.2.3.2. Construction de la signature prédictive

La signature sera composée des 5 cytokines les plus significatives et des variables cliniques précédemment retenues (modèle de Cox multivarié, $p < 0,05$). Il a été décidé de sélectionner 5 cytokines afin de proposer une signature réalisable en pratique quotidienne. Le score est égal à la somme des valeurs des co-variables multipliées par les logarithmes des risques relatifs. Les variables sont soit des cytokines soit des variables cliniques. Lorsque le logarithme du risque relatif est supérieur à 0, le risque relatif associé à cette variable est supérieur à 1 et le score augmente avec la valeur de ce facteur de risque. En revanche, lorsque le logarithme du risque relatif est inférieur à 1 le score diminue avec la valeur de ce facteur protecteur. Ainsi, plus le score est élevé, plus le risque de GVH chronique est élevé.

La courbe ROC à 2 ans représente les sensibilités (axe y) en fonction de 1 moins les spécificités (axe x). Si l'aire sous la courbe (AUC) est égale à 1, le score est parfait, il s'agit d'un marqueur de substitution parfait. En pratique, l'aire sous la courbe est comprise entre 0,5 (score non-informatif) et 1 (score parfait). La discrimination commence à être intéressante à 0,6, bonne à 0,7 et très bonne au-delà de 0,8. Une AUC supérieure à 0,9 est associée à un marqueur de pronostic exceptionnel.

Une des difficultés de l'analyse est l'effectif réduit de patients par rapport au nombre de variables. Ce problème entraîne souvent une sur-paramétrisation du modèle (over-

fitting). Le score est alors remarquablement performant sur un échantillon d'étude, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles. Pour contrôler cet over-fitting, nous avons appliqué une méthode de ré-échantillonnage par bootstrap 0,632 (Fig. 13). Le principe est de tirer au hasard un échantillon de même taille que l'échantillon initial. Les coefficients du score sont calculés à partir de cet échantillon d'apprentissage. L'AUC à 2 ans est calculée sur tous les individus qu'ils soient inclus ou non dans l'échantillon d'apprentissage. Cette aire surestime le pouvoir pronostique. On calcule donc aussi à partir des individus non-inclus dans l'échantillon d'apprentissage. Comme cette aire-sous-estime le pouvoir pronostique, une moyenne pondérée est calculée entre ces deux aires. Cette moyenne a pour objectif d'être le plus proche du pouvoir pronostique réel. Cette procédure est répétée de nombreuses fois pour obtenir un estimateur moyen de l'aire sous la courbe ainsi que son intervalle de confiance.

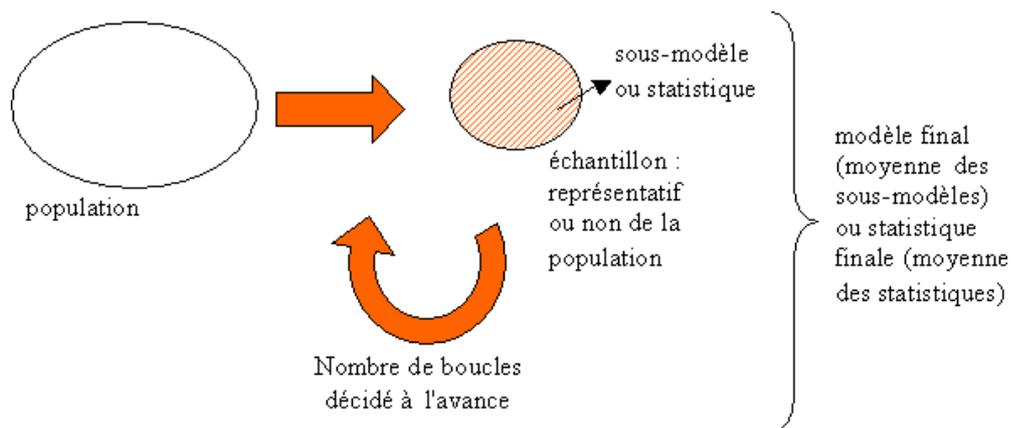


Figure 13. Principe du « boot-strap »

3.2.3.3. Analyse des corrélations entre les signatures et la mortalité non-liée à la rechute

Pour étudier la mortalité nonliée à la rechute, le modèle de Fine et Gray a été utilisé(98). Trois groupes de patients ont été définis pour chaque signature en fonction des tertiles.

Logiciel

Les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel R[R Development Core Team]. Les courbe ROC (courbe sensibilité/spécificité) ont été calculées à partir du « package survival ROC », l'estimateur de Fine et Gray grâce au package timereg.

3.2. Résultats

3.3.1. Devenir des patients

La survie globale à 2 ans pour cette population est de 69% (95IC=62-77%) (Fig.14).

L'incidence cumulée de la rechute est de 27% à 1an et 30% à 2 ans, la majorité des rechutes ont donc lieu dans la première année après la greffe (Fig.15). L'incidence cumulée de la mortalité liée à la rechute ou à la progression est de 19% à 2 ans.

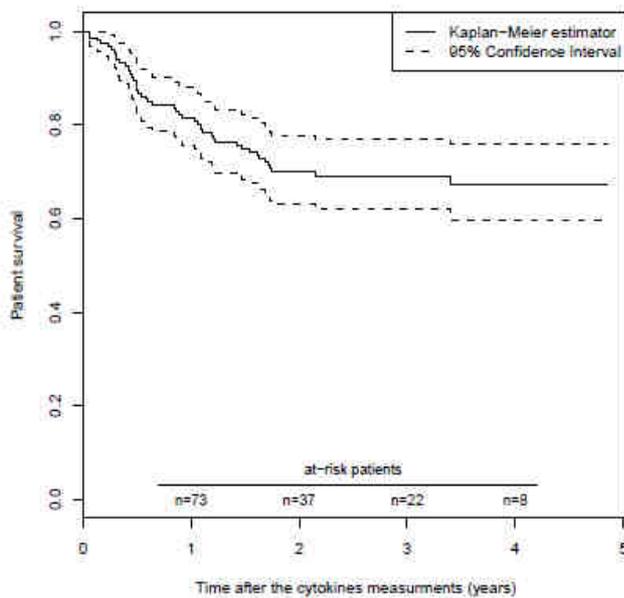


Figure 14. Courbe de survie globale de la population

La NRM est à 11,3% à 2 ans (Fig.15).

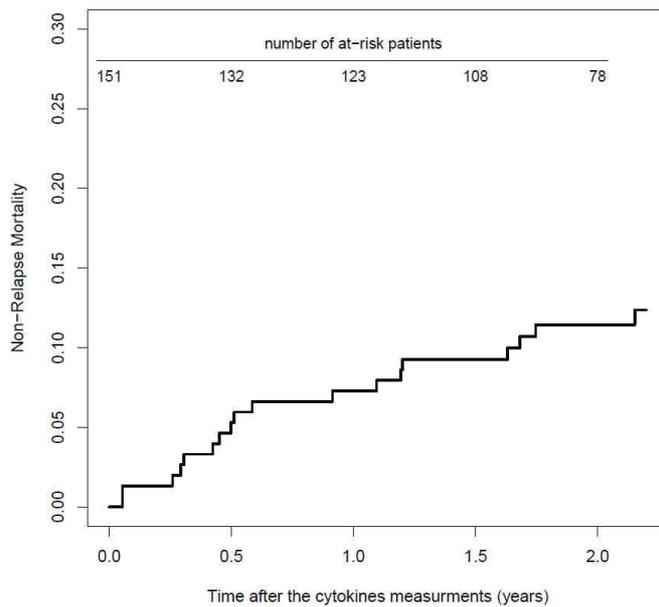
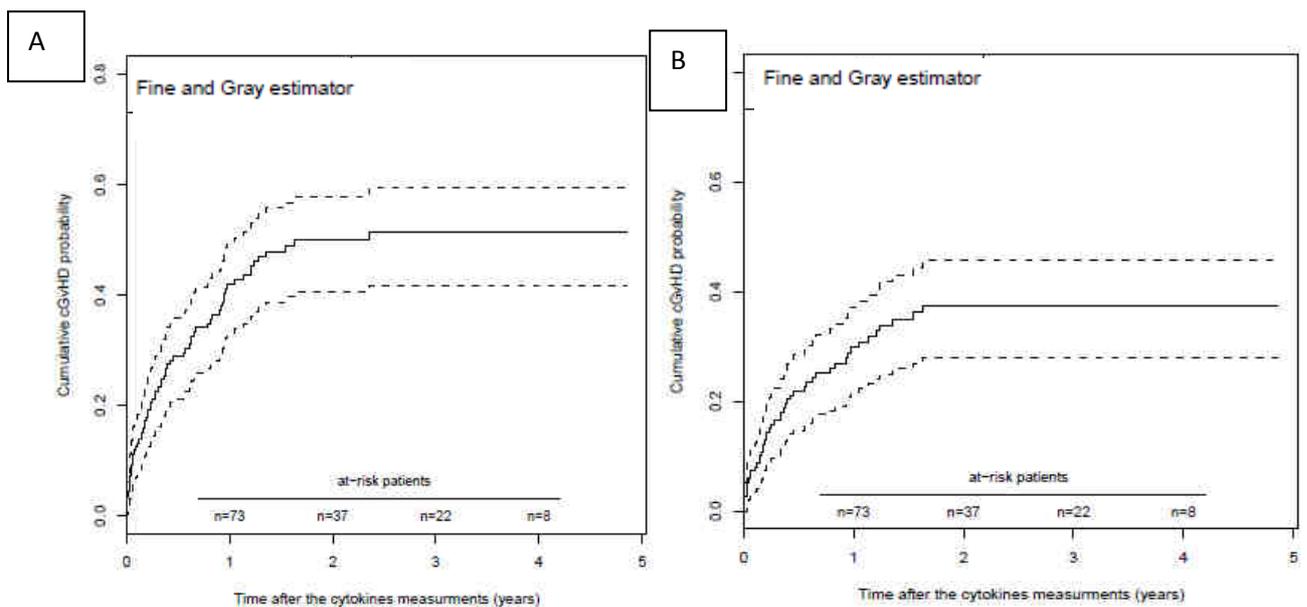


Figure 15. Courbe de la mortalité non liée à la rechute

Dans la population étudiée, 68 patients ont développé une GVH chronique : 23 une forme localisée/limitée et 45 une forme extensive après un temps médian de 0,33 an (rang : 0,05-1,63) après le dosage des cytokines. Deux ans après le dosage des cytokines, l'incidence cumulée de développer une GVH chronique est de 50% (95%IC, 41-60%) et de 38% pour une GVH chronique extensive (95%IC, 28-46%) (Fig. 16 A et B).

Figure 16 A et B. Incidence cumulée de survenue de GVH chronique (B). Incidence cumulée de survenue de GVH chronique extensive (C).



Parmi les 45 patients ayant développé une GVH chronique extensive, 13 sont décédés (29%) : 12 patients sont décédés de GVH et d'infections (6 dont la cause principale retenue est la GVH) et un patient est décédé suite à la rechute de sa maladie. Parmi les 23 patients ayant développé une GVH chronique limitée, deux (9%) sont décédés : un patient est suite à la rechute de sa maladie et un patient est décédé d'un syndrome lymphoprolifératif EBV induit.

3.3.2. Corrélation entre les cytokines et la survenue d'une GVH chronique extensive

3.3.2.1. Analyses univariées

En analyse uni-variée, 5 facteurs cliniques sont associées de façon significative au seuil de 0,20 à la survenue d'une GVH chronique extensive (Tableau VII). Ainsi, le sexe masculin, le fait d'être de sexe masculin avec un donneur de sexe féminin, un greffon d'origine familial (versus donneur de ficher ou sang de cordon placentaire), le greffon de type cellules CSP (versus moelle osseuse et sang de cordon placentaire) et un antécédent de GVH aiguë sont les cinq facteurs de risque d'avoir une GVH chronique extensive.

Tableau VII. Analyse uni-variée des facteurs cliniques

variables	HR	Valeur de p
Sexe de receveur (homme vs femme)	1,54	0,15
Sexe du donneur (homme vs femme)	1,02	0,94
Sexe (homme receveur et femme donneuse vs autres combinaisons)	1,52	0,18
Type de donneur (familial vs autres)	1,11	0,17
Type de conditionnement (myéloablatif vs atténué)	1,10	0,77
Sérologie CMV du donneur (positive vs négative)	1,44	0,21
Sérologie CMV du receveur (positive vs négative)	0,95	0,87
Sérologie CMV (sérologies receveur et donneur positives vs autres)	2,61	0,019
Source du greffon (CSP vs moelle et sang de cordon placentaire)	2,61	0,02
Prophylaxie de la GVH (un médicament vs autres)	1,03	0,92
Antécédents de GVH aigue (oui vs non)	2,25	0,0085
Statut de la maladie à la greffe (rémission complète vs autre)	0,81	0,48
Types de pathologies (myéloïdes vs autres)	0,80	0,44
Age du receveur (plus de 50 ans vs moins de 50 ans)	1,37	0,30
Nombre de CD34 /kg du receveur (plus de 6 vs autres)	1,03	0,93

Tableau VIII : Analyse univariée des dosages cytokiniques

Cytokines	N	N ₀ ⁺	N ₁ ⁺	moy. ⁺	e.t. ⁺	min ⁺	max ⁺	seuil*	HR	pvalue
MDC	152	40	112	1431,89	1723,47	49,34	10053,35	504,97	0,29	<0,0001
IL10	152	101	51	14,39	38,73	2,08	433,61	8,97	2,94	0,0001
IP10	152	84	68	2499,48	4101,53	2,92	24244,34	1166,34	2,97	0,0002
IL15	152	131	21	3,61	7,70	1,67	90,14	5,38	2,98	0,0010
TARC	152	81	71	1236,32	1953,70	4,97	5144,85	244,40	0,39	0,0025
FLT.3L	152	84	68	94,78	115,23	4,02	903,54	70,29	2,30	0,0038
IL3	152	92	60	10,33	13,34	1,45	75,88	7,64	2,28	0,0040
RANTES	151	74	77	41311,25	24703,62	1458,00	93825,00	41100,00	0,42	0,0045
IL12p40	152	85	67	26,30	64,83	2,51	739,95	13,32	0,41	0,0080
FRACTALKINE	152	63	89	65,17	229,67	6,79	2400,55	11,25	0,50	0,0151
IFN _g	152	46	106	18,80	30,68	2,12	240,54	3,43	0,51	0,0207
IL2ra	152	71	81	506,22	938,44	7,72	8522,69	231,04	1,99	0,0217
TRAIL	152	130	22	23,16	25,22	4,85	120,46	50,09	1,93	0,0512
MIP1b	152	77	75	65,95	48,73	2,21	462,45	57,06	1,72	0,0652
BAFF	151	91	60	3566,80	2194,90	379,00	11960,00	3804,00	0,55	0,0663
TGFa	152	22	130	8,34	9,60	0,85	88,56	1,69	0,53	0,0725
MCP1	152	18	134	758,42	857,74	2,27	4540,87	253,63	0,52	0,0887
IL8	151	82	69	40,37	34,54	0,42	260,39	34,61	1,62	0,1008
IL2	152	136	16	1,88	7,08	0,54	77,47	1,75	1,92	0,1073
PDGFABBB	152	25	127	8235,88	3073,73	1,05	9847,81	4122,41	0,57	0,1259
MIP1a	152	88	64	26,54	20,35	3,18	97,53	24,68	0,64	0,1485
ELAFIN	151	109	42	10028,51	8492,81	870,00	53650,00	10667,00	1,53	0,1589
IL6	152	93	59	8,07	14,51	0,89	102,3	3,68	1,48	0,1823
IL9	152	136	16	3,42	4,33	2,31	39,53	4,13	0,40	0,1929
TNFa	152	136	16	12,01	7,65	0,76	49,25	19,97	0,40	0,1948
VEGF	152	109	43	153,83	208,29	10,57	1996,39	165,97	1,44	0,2242
MCP3	152	133	19	9,79	16,55	5,67	167,97	10,87	1,53	0,2957
IL17	152	90	62	5,66	15,40	0,60	120,19	0,60	0,75	0,3435
IL7	152	117	35	2,59	3,59	1,34	26,54	1,34	0,70	0,3519
IFNa2	152	108	44	8,99	12,11	4,15	78,01	4,34	1,29	0,4111
CD40L	152	24	128	8806,31	2850,88	2,95	10009,50	7043,93	0,77	0,5075
IL1a	152	135	17	15,39	45,29	3,76	362,06	18,71	0,72	0,5348
IL4	152	130	22	13,55	31,94	5,96	250,42	8,67	1,18	0,6748

3.3.2.2. Analyses multivariées

En analyse multivariée, l'antécédent de GVH aiguë et les CSP comme source de greffon sont significativement corrélées avec la survenue d'une GVHc. Les patients ayant déclaré une GVH aiguë ont 2,60 fois plus de risque de développer une GVH chronique extensive ($p=0,0019$) et les patients ayant reçu des CSP comme source de greffon ont, 3,1 fois plus de risque de déclarer une GVH chronique extensive ($p=0,0067$).

Concernant les cytokines, 10 cytokines auraient un lien avec la survenue d'un GVH chronique extensive indépendamment des deux facteurs cliniques précédents. De fortes valeurs d'IP10, d'IL10, d'IL2ra, de MIP1 β et d'IL15 semblent associées à une augmentation du risque de GVH chronique extensive. En revanche, de fortes valeurs

MDC, de Fractalkine, de RANTES, de TARC et d'IL12p40 semblent associées à une diminution du risque de GVH chronique extensive (Tableau VIII).

Cytokines (pg/mL)	seuil	HR	P
MDC	504	0,33	0,0005
IP10	1166	2,74	0,0010
TARC	244	0,40	0,0041
FRACTALKINE	11	0,46	0,0081
RANTES	41100	0,42	0,0083
MIP1 β	57	2,17	0,0108
IL10	9	2,23	0,0112
IL12p40	13	0,43	0,0155
IL2 α	231	2	0,0261
IL15	5	2,25	0,0280

Tableau IX. Analyse multivariée des cytokines en prenant en compte les paramètres cliniques

3.3.3. La signature globale prédictive de survenue de la GVH chronique extensive dans les 2 ans post-allogreffe

Le score est composé des 2 facteurs cliniques et des 5 cytokines les plus significatives afin de réaliser un score réalisable facilement en pratique quotidienne.

Variables	Coefficient
MDC>504,97	-0,99
IP10>1166,34	+1,24
TARC>244,40	-0,69
FRACTALKINE>11,25	-0,81
MIP1 β >57,06	+0,76
Antécédent de GVHa	+0,80
Source de greffon CSP	+1,32

Tableau X. Eléments du score prédictif de survenue de la GVH

Pour chaque patient, le score est égal à la somme des coefficients présentés dans le tableau multiplié par 1 si le paramètre correspondant est supérieur au seuil et par 0 sinon. Par exemple, si un patient a un dosage de MDC à 800pg/mL, d'IP10 à 500pg/mL... son score est égale à $-0,99 \times 1 + 1,24 \times 0$... L'estimation, avec méthode de ré-échantillonnage, de l'aire sous la courbe (AUC) est de 0,80 (IC95%, 0,72-0,87) ce qui correspond à un bon pouvoir prédictif (Fig. 15).

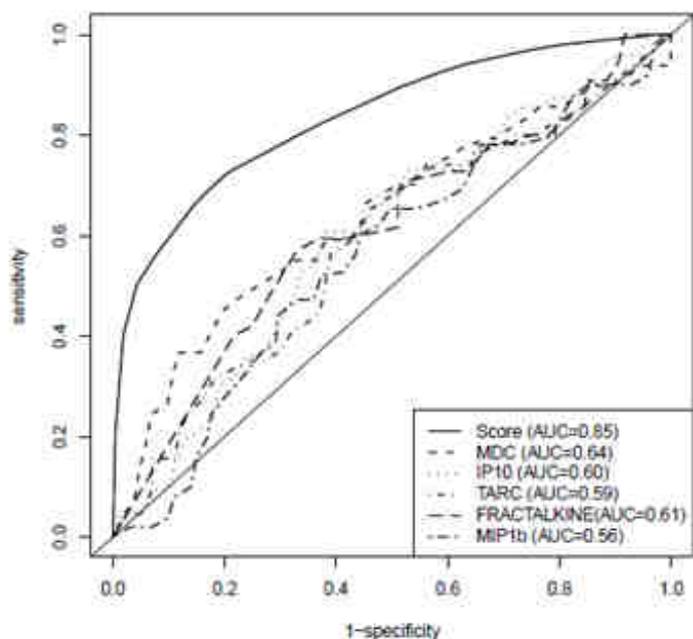


Figure 17. Courbes ROC du score prédictif de survenue des GVH chroniques extensives.

La courbe représentée ici n'est pas corrigée (d'où AUC=0,85). [Une meilleure estimation de cette aire est offerte par l'algorithme de ré-échantillonnage (AUC=0,80) mais l'algorithme rend difficile toute représentation clinique.]

3.3.4. Etude de la mortalité non liée à la rechute (NRM)

La mortalité non liée à la rechute est de 11,4% à 2 ans (Fig. 15).

Pour étudier la corrélation entre la NRM et la signature, trois groupes de patients ont été réalisés. Le groupe le plus à risque de GVH chronique extensive (score >1,50) semble se distinguer des deux autres groupes. Ainsi, les patients avec un score <0,12 ont significativement moins de risque de décès non lié à la rechute ($p=0,0082$). La mortalité est estimée respectivement à 6, 7,5 et 21,4% dans les groupes Q1, Q2 et Q3 à 2 après le dosage des cytokines.

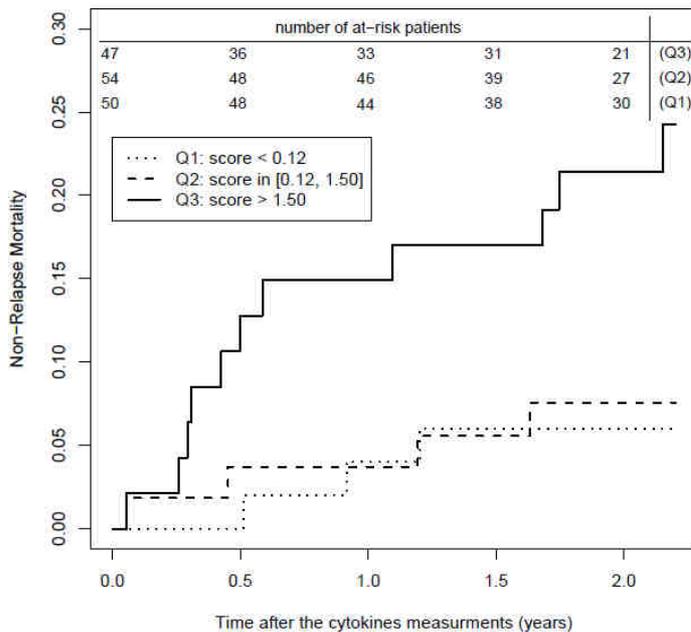


Figure 18. Mortalité non liée à la rechute selon le score de survenue de GVH chronique extensive

3.4. Discussion

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est une procédure thérapeutique de plus en plus réalisée en onco-hématologie. Cette procédure est basée sur deux mécanismes d'action principaux : le conditionnement qui a pour but d'induire une cytoréduction tumorale et une tolérance immunologique afin de permettre une prise du greffon et le contrôle anti-tumoral immunologique appelé GVL ou GVT (effet du greffon contre la leucémie ou la tumeur). Ces dix dernières années, la réalisation de cette stratégie thérapeutique a nettement évolué en raison des développements technologiques et médicamenteux avec :

- (a) les greffes de cellules souches hématopoïétiques sanguines obtenues après mobilisation par des facteurs de croissance hématopoïétiques et les greffes de sang placentaire ;
- (b) l'augmentation des greffes à partir de donneurs volontaires et le développement des greffes haplo-identiques ;
- (c) l'immunomodulation guidée par le suivi du chimérisme et de la maladie résiduelle après la greffe avec réinjection de lymphocytes du donneur ;

- (d) les conditionnements d'intensité ou de toxicité réduite visant à réduire la toxicité en limitant l'intensité chimiothérapique du conditionnement et en favorisant l'effet anti-tumoral immunologique ;
- (e) la chimiothérapie séquentielle suivie d'allogreffe après conditionnement non myélo-ablatif dans le cas d'hémopathies réfractaires ou à très mauvais pronostic ;
- (f) les modifications des indications en particulier par les progrès de la biologie moléculaire pour les leucémies aiguës et le développement de thérapies dites ciblées.

Cependant, bien que des progrès majeurs aient été réalisés depuis les premières allogreffes l'allo-CSH reste un traitement très lourd avec un taux de mortalité non liée à la rechute de la maladie qui reste aux environs de 20% à un an en onco-hématologie. Avec l'amélioration de la survie globale après allogreffe, le problème de la GVH chronique est devenu un des enjeux principaux de cette immunothérapie. A ce jour, il n'y a pas eu de réelle identification de biomarqueurs de la GVH chronique.

Dans cette étude, nous avons étudié les caractéristiques cliniques et biologiques de 152 patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH à Nantes entre 2005 et 2008. La GVH chronique étant une affection dysimmunitaire, nous avons dosé 41 cytokines impliquées dans des pathologies auto-immunes, inflammatoires ou déjà décrites dans la GVH aiguë ou chronique à partir des sérums prélevés à J100 post-allogreffe. En raison de l'implication thérapeutique, nous avons décidé de centrer cette analyse sur la GVH chronique extensive. Les deux objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier la corrélation entre la sécrétion de cytokines en associant les caractéristiques cliniques de la greffe et la survenue d'une GVH chronique extensive puis de déterminer un score prédictif de survenue de cette affection.

1- Identification de la corrélation entre d'une part les caractéristiques de la greffe et les cytokines à 3 mois post-allogreffe d'autre part la survenue d'une GVH chronique extensive. En analyse multivariée, deux critères cliniques ont été retrouvés : l'antécédent de GVH aiguë et les CSP en tant que sources du greffon. L'antécédent de survenue de GVH aiguë est un facteur de risque de développement de GVH chronique bien établi dans la littérature (57) traduisant le continuum entre des deux syndromes. Le deuxième facteur de risque est l'utilisation de CSP comme source de greffon, cette donnée a été décrite dans de nombreuses études (99). Cette forte association entre

cette source de greffon et la survenue de GVH chronique et non de GVH aiguë suggère une physiopathologie différente entre ces deux syndromes bien que liés entre eux.

Concernant l'analyse cytokinique, 2 groupes de cinq cytokines dont une concentration élevée dans le sérum à J100 était statistiquement liée, de manière significative, au développement d'une GVH chronique extensive. Il s'agit d'IP10, IL-10, IL-2 α , MIP1 β et IL15. Ces cytokines sont donc interprétées comme des facteurs de risque. L'autre groupe est composé de cinq cytokines dont des concentrations élevées sont associées à une diminution du risque de développement d'une GVH chronique extensive. Il s'agit de : MDC, Fractalkine, RANTES, TARC et d'IL12p40. Elles sont donc interprétées comme des facteurs protecteurs. IP10 (CXCL10) ou « interferon γ -induced protein 10 » est une chémokine pro-inflammatoire impliquée dans la migration des leucocytes activant les lymphocytes T dans le cadre d'une polarisation T_H1, les cellules NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Une augmentation de sa sécrétion est décrite dans de nombreuses pathologies infectieuses, auto-immunes, chroniques inflammatoires et tumorales (100). L'IP10 est aussi impliqué dans la pathogénie de la GVH aiguë cutanée (101). Le ligand pour IP10 est CXCR3 et l'élévation de son taux sérique pourrait suggérer que les lymphocytes T CXCR3+ jouent un rôle important dans le développement de la GVH chronique extensive. Cette donnée est en accord avec les résultats de l'étude de Imanguli et coll. (16) qui ont montré que les cellules présentant une polarisation T_H1 étaient des effecteurs majeurs dans la physiopathologie de la GVH chronique. Dans cette étude, où a été analysée histologiquement de la muqueuse buccale de patients atteints de GVH chronique, l'accumulation de cellules effectrices T-bet+, facteur de transcription exprimé spécifiquement par les cellules T_H1, était associée à une augmentation de l'expression du récepteur CXCR3. Dans une autre étude, Chen and coll. (17) ont montré que les cellules T_H1 étaient capables d'induire des lésions tissulaires de type auto-immune. De façon intéressante, ces auteurs ont montré que la réponse Th17 n'était pas nécessaire pour l'induction d'une GVH chronique et qu'un processus de type Th1 était probablement responsable des lésions pathologiques primaires. Nous avons aussi trouvé une corrélation entre une concentration élevée d'IL-2R α et le développement de la GVHc. L'IL-2 a un rôle primordial dans la régulation de l'immunité et de la tolérance (102) et est essentiel pour le développement des lymphocytes T régulateurs naturels d'origine thymique et dans la régulation de lymphocytes T régulateurs induits (66). Cette cytokine, sécrétée par les lymphocytes T activés, se fixe sur un récepteur ayant 3 sous-unités, IL-2R α (CD25), IL-

2 β et IL-2R γ . Par ailleurs, l'IL-2 participe au développement des lymphocytes T mémoires (103) à la différenciation de ces cellules T en cellules effectrices (104). Une des hypothèses serait qu'une concentration élevée de IL-2R α est secondaire à une sécrétion élevée d'IL-2 par les cellules effectrices induisant une réaction de type « auto-immun » ou plutôt « allo-immun ». Paczesny et coll. avaient trouvé qu'IL-2R α était un biomarqueur de la GVH aiguë et le meilleur discriminateur unique (95). Un dosage élevé d'IL-15 est aussi corrélé au développement d'une GVH chronique extensive. L'IL-15 est une cytokine pléiotrope exprimée par un grand nombre de types cellulaires et tissulaires, tels que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les kératinocytes et les cellules épidermiques (105). Une concentration élevée d'IL-15 a été décrite dans de nombreuses pathologies auto-immunes et inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (106). L'IL-15 a aussi été décrite dans la GVH aiguë (107). MIP-1 β est sécrétée principalement par les monocytes et par les lymphocytes B et T activés. Cette chémokine a été décrite dans diverses pathologies auto-immunes et est impliquée dans la polarisation de type T_H1 (108). TARC (thymus and activation-regulated chemokine) ou CCL17 et MDC (macrophage-derived chemokine) ou CCL22 seraient des facteurs protecteurs de survenue de GvH chronique extensive. Ces deux chémokines sont exprimées par les monocytes et les cellules dendritiques. Leur ligand CCR4 est exprimé par les cellules de type T_H2 et les lymphocytes T régulateurs (109). Fractalkine (CX3CR1) est une cytokine sécrétée par les cellules dendritiques et les monocytes. Uhea et coll. avaient montré son implication dans un modèle murin de GVH (110). L'étude de Luft et coll. n'avait pas trouvé de corrélation entre Fractalkine dans le sérum et la survenue d'une GVH chronique réfractaire (111). Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre le dosage de BAFF et la survenue d'une GVH chronique extensive. Une des explications pourrait être que BAFF a été décrit comme un facteur diagnostique (86, 112) et non prédictif.

Afin d'éviter l'interférence de facteurs confondants, les patients présentant un antécédent de maladie veino-occlusive ou de choc septique ou ayant une infection aiguë à J100 n'ont pas été inclus. Il faut cependant préciser que le but de l'étude n'était pas d'identifier des biomarqueurs permettant de différencier le risque de développement de GVH chronique d'autres complications liées au traitement en raison de l'effectif réduit de la population. Les cytokines identifiées dans cette étude évoquent plutôt une balance immunologique en faveur d'une polarisation de type T_H1 comme voie immunologique

initiale du développement de la GVH chronique. Il n'est toutefois pas possible de conclure de façon formelle sur la physiopathologie de cette affection. En effet, le développement de la GVH chronique était parfois observé à distance du dosage effectué dans le sérum, de plus cette affection est clairement complexe et multiparamétrique impliquant de nombreux acteurs cellulaires comme en témoignent probablement le nombre de cytokines identifiées dans cette étude et surtout le nombre d'études sur la physiopathologie de la GVH chronique.

2- Détermination d'un score prédictif clinico-biologique de survenue de GVH chronique extensive à 2 ans réalisable en pratique clinique et en évitant le risque de surestimation des résultats par l'application d'une technique de ré-échantillonnage. La signature prédictive est composée des 5 cytokines les plus significatives et 2 données cliniques statistiquement significatives. Les cytokines retenues sont IP10, MDC, TARC, Fractalkine et MIP-1 β et les deux données cliniques sont la source de greffon de type CSP et un antécédent de GVH aiguë. Le score obtenu possède un bon pouvoir prédictif (AUC corrigée de 0,80).

Ce score prédictif de survenue de GVH chronique extensive était aussi pronostique en raison de sa corrélation avec la NRM. Ce résultat évoque un effet seuil. En effet, les patients ayant un score supérieur à 1,50 ont une NRM significativement augmentée à 21,4%.

Ces résultats intéressants doivent toutefois être pondérés en raison des limitations de cette étude. Tout d'abord, il s'agit d'une étude rétrospective rendant difficile le codage de la survenue de GVH chronique et son score de gravité. N'étant pas utilisée de façon courante en clinique, la classification du NIH n'a pu être appliquée à cette cohorte de façon rétrospective. La présence et la gravité d'une GVH chronique était donc définie par la conclusion du clinicien, la description clinique, les éventuels examens anatomo-pathologiques et la notion d'introduction d'un traitement local ou systémique immunosuppresseur. Ensuite, même si cette étude est réalisée chez 152 patients allogreffés, ce qui représente un nombre conséquent de patient pour une thérapeutique qui reste rare, ce nombre reste relativement faible du point de vue statistique, d'autant plus que la GVH chronique se développe chez moins de 50% de ces patients et est de présentation polymorphe et multiparamétrique. De plus, notre cohorte est assez hétérogène en particulier concernant le type de conditionnement réalisé. La physiopathologie de la GVH chronique n'est probablement pas tout à fait identique

selon le type de conditionnement, en particulier entre un conditionnement myéloablatif et un conditionnement d'intensité réduite. Ainsi que le préconise le consensus du NIH sur les études portant sur la GVH chronique, les études sur cette thématique doivent être en priorité multicentriques et utiliser les critères homogènes tant diagnostiques que de sévérité et de réponse (113). Nous n'avons pas étudié le profil cytokinique en fonction du type d'organe atteint par la GVH chronique en raison du faible effectif. Finalement, il serait particulièrement intéressant de focaliser cette étude de score sur les GvH chroniques extensives réfractaires au traitement qui est un des enjeux majeurs de l'allogreffe.

Ce score ne peut donc, bien sûr, pas encore être utilisé en pratique clinique. Il est nécessaire auparavant de valider ces résultats sur une autre cohorte, étude complémentaire actuellement engagée puis de le tester dans une étude multicentrique.

Conclusion

La réaction chronique du greffon contre l'hôte survient chez près de la moitié des patients après CSH dont elle représente la principale complication à moyen et long terme. Malgré l'effet anti-tumoral associé, elle est à l'origine d'une morbidité importante, soit par elle-même avec une détérioration importante de la qualité de vie, soit par les complications- souvent infectieuses- liées à son traitement.

A partir de l'étude des caractéristiques cliniques et du profil cytokinique dosé à J100 après l'allogreffe CSH, nous avons retenu deux facteurs cliniques liés, de façon statistiquement significative, à la survenue d'une GVH chronique extensive- l'antécédent de GVH aiguë et les CSP comme source du greffon – et dix cytokines. Les cytokines IP10, IL-10, IL2 α , MIP1 β et IL-15 semblent associées à une augmentation du risque de GVH chronique extensive alors que de fortes valeurs de MDC, Fractalkine, RANTES, TARC et IL12p40 sont associées à une diminution de ce risque et peuvent être considérées comme facteurs protecteurs. Les cytokines identifiées nous orientent sur un profil de polarisation de type T_H1 nécessaire au développement d'une GVH chronique extensive.

Nous avons voulu ensuite établir un score clinico-biologique prédictif de la survenue de GVH chronique extensive des deux paramètres cliniques retenus et 5 cytokines afin de pouvoir être un score réalisable en pratique clinique. Cette signature présente un bon pouvoir pronostique avec une AUC de 0,80 et ceci obtenu après technique de ré-échantillonnage. De plus, ce score semble corrélé à la NRM. Ce score est donc non seulement prédictif de la survenue de la GVH chronique extensive mais comporte aussi une valeur pronostique.

Cependant, ces résultats nécessitent d'être validés sur un plus grand nombre de patients et de façon prospective avant de pouvoir utiliser ce score dans le suivi des patients allogreffés. Le pronostic de la GVH déterminé par ce score pour chaque patient pourrait alors permettre d'adapter la prise en charge thérapeutique en modulant la surveillance clinique et l'intensité du traitement.

Références

1. Shulman, H.M., Sullivan, K.M., Weiden, P.L., McDonald, G.B., Striker, G.E., Sale, G.E., Hackman, R., Tsoi, M.S., Storb, R., and Thomas, E.D. 1980. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 69:204-217.
2. Zhu, J., and Paul, W.E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.
3. Filipovich, A.H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J.R., Lee, S.J., Martin, P., Chien, J., Przepiorka, D., Couriel, D., et al. 2005. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:945-956.
4. Sackstein, R. 2006. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:2-8.
5. Hymes, S.R., Alousi, A.M., and Cowen, E.W. 2012. Graft-versus-host disease: part I. Pathogenesis and clinical manifestations of graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* 66:515 e511-518; quiz 533-514.
6. Hymes, S.R., Alousi, A.M., and Cowen, E.W. 2012. Graft-versus-host disease: part II. Management of cutaneous graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* 66:535 e531-516; quiz 551-532.
7. Mohty, M., and Apperley, J.F. Long-term physiological side effects after allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010:229-236.
8. Passweg, J.R., Baldomero, H., Gratwohl, A., Bregni, M., Cesaro, S., Dreger, P., Witte, T.D., Farge-Bancel, D., Gaspar, B., Marsh, J., et al. 2012. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant*.
9. Appelbaum, F.R. 2007. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 357:1472-1475.
10. Bortin, M.M. 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 9:571-587.
11. Arora, M., Nagaraj, S., Witte, J., DeFor, T.E., MacMillan, M., Burns, L.J., and Weisdorf, D.J. 2009. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. *Bone Marrow Transplant* 43:149-153.
12. Pavletic, S., and Vogelsand, G.B. 2008. Treatment of high-risk chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:1436-1437.
13. Arora, M., Klein, J.P., Weisdorf, D.J., Hasebroek, A., Flowers, M.E., Cutler, C.S., Urbano-Ispizua, A., Antin, J.H., Bolwell, B.J., Boyiadzis, M., et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. *Blood*.
14. Socie, G., Stone, J.V., Wingard, J.R., Weisdorf, D., Henslee-Downey, P.J., Bredeson, C., Cahn, J.Y., Passweg, J.R., Rowlings, P.A., Schouten, H.C., et al. 1999. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* 341:14-21.
15. Syrjala, K.L., Langer, S.L., Abrams, J.R., Storer, B., Sanders, J.E., Flowers, M.E., and Martin, P.J. 2004. Recovery and long-term function after hematopoietic cell transplantation for leukemia or lymphoma. *JAMA* 291:2335-2343.
16. Imanguli, M.M., Swaim, W.D., League, S.C., Gress, R.E., Pavletic, S.Z., and Hakim, F.T. 2009. Increased T-bet+ cytotoxic effectors and type I interferon-mediated processes in chronic graft-versus-host disease of the oral mucosa. *Blood* 113:3620-3630.
17. Chen, X., Das, R., Komorowski, R., van Snick, J., Uyttenhove, C., and Drobyski, W.R. 2010. Interleukin 17 is not required for autoimmune-mediated pathologic damage during chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:123-128.
18. Jacobson, L.O., Marks, E.K., and et al. 1949. The role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 70:740-742.

19. Jacobson, L.O., Simmons, E.L., Marks, E.K., and Eldredge, J.H. 1951. Recovery from radiation injury. *Science* 113:510-511.
20. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., and Shelton, E. 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12:197-201.
21. Nowell, P.C., Cole, L.J., Habermeyer, J.G., and Roan, P.L. 1956. Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res* 16:258-261.
22. Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W., and Loutit, J.F. 1956. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177:452-454.
23. Mathe, G., Jammet, H., Pendic, B., Schwarzenberg, L., Duplan, J.F., Maupin, B., Latarjet, R., Larrieu, M.J., Kalic, D., and Djukic, Z. 1959. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol* 4:226-238.
24. Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. 1962. Transplantation of marrow and whole organs: experiences and comments. *Can Med Assoc J* 86:435-444.
25. Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. 1960. Irradiation and marrow transplantation: studies in Cooperstown. *Lancet* 1:1289-1290.
26. Billingham, R.E. 1966. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62:21-78.
27. Little, M.T., and Storb, R. 2002. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2:231-238.
28. Dausset, J. 1958. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 20:156-166.
29. Storb, R., Epstein, R.B., Graham, T.C., and Thomas, E.D. 1970. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation* 9:240-246.
30. Deeg, H.J., Storb, R., Weiden, P.L., Raff, R.F., Sale, G.E., Atkinson, K., Graham, T.C., and Thomas, E.D. 1982. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. *Transplantation* 34:30-35.
31. Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. 1956. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2:626-627.
32. Weiden, P.L., Flournoy, N., Thomas, E.D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C.D., and Storb, R. 1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300:1068-1073.
33. Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R., and Thomas, E.D. 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 304:1529-1533.
34. Sullivan, K.M., Weiden, P.L., Storb, R., Witherspoon, R.P., Fefer, A., Fisher, L., Buckner, C.D., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Badger, C., et al. 1989. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 73:1720-1728.
35. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., Rozman, C., Speck, B., et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75:555-562.
36. Kolb, H.J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76:2462-2465.
37. Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., et al. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86:2041-2050.
38. Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., et al. 1989. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321:1174-1178.
39. Ljungman, P., Bregni, M., Brune, M., Cornelissen, J., de Witte, T., Dini, G., Einsele, H., Gaspar, H.B., Gratwohl, A., Passweg, J., et al. 2010. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant* 45:219-234.

40. Klein, J., and Sato, A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:702-709.
41. Riddell, S.R., Berger, C., Murata, M., Randolph, S., and Warren, E.H. 2003. The graft versus leukemia response after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev* 17:153-162.
42. Miklos, D.B., Kim, H.T., Miller, K.H., Guo, L., Zorn, E., Lee, S.J., Hochberg, E.P., Wu, C.J., Alyea, E.P., Cutler, C., et al. 2005. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 105:2973-2978.
43. 2001. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. Recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Cytotherapy* 3:41-54.
44. Ho, V.T., Revta, C., and Richardson, P.G. 2008. Hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: update on defibrotide and other current investigational therapies. *Bone Marrow Transplant* 41:229-237.
45. Carreras, E., Diaz-Beya, M., Rosinol, L., Martinez, C., Fernandez-Aviles, F., and Rovira, M. 2011. The incidence of veno-occlusive disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has diminished and the outcome improved over the last decade. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:1713-1720.
46. Reddy, P., and Ferrara, J.L. 2003. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 17:187-194.
47. Atkinson, K., Horowitz, M.M., Gale, R.P., van Bekkum, D.W., Gluckman, E., Good, R.A., Jacobsen, N., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringden, O., et al. 1990. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 75:2459-2464.
48. Kollman, C., Howe, C.W., Anasetti, C., Antin, J.H., Davies, S.M., Filipovich, A.H., Hegland, J., Kamani, N., Kernan, N.A., King, R., et al. 2001. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 98:2043-2051.
49. Remberger, M., Kumlien, G., Aschan, J., Barkholt, L., Hentschke, P., Ljungman, P., Mattsson, J., Svennilson, J., and Ringden, O. 2002. Risk factors for moderate-to-severe chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:674-682.
50. Randolph, S.S., Gooley, T.A., Warren, E.H., Appelbaum, F.R., and Riddell, S.R. 2004. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 103:347-352.
51. Pavletic, S.Z., Carter, S.L., Kernan, N.A., Henslee-Downey, J., Mendizabal, A.M., Papadopoulos, E., Gingrich, R., Casper, J., Yanovich, S., and Weisdorf, D. 2005. Influence of T-cell depletion on chronic graft-versus-host disease: results of a multicenter randomized trial in unrelated marrow donor transplantation. *Blood* 106:3308-3313.
52. Mohty, M., Bilger, K., Jourdan, E., Kuentz, M., Michallet, M., Bourhis, J.H., Milpied, N., Sutton, L., Jouet, J.P., Attal, M., et al. 2003. Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia* 17:869-875.
53. Mohty, M., Kuentz, M., Michallet, M., Bourhis, J.H., Milpied, N., Sutton, L., Jouet, J.P., Attal, M., Bordignon, P., Cahn, J.Y., et al. 2002. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood* 100:3128-3134.
54. Mengarelli, A., Iori, A.P., Romano, A., Cerretti, R., Cerilli, L., De Propriis, M.S., Fenu, S., Moleti, M.L., De Felice, L., Girelli, G., et al. 2003. One-year cyclosporine prophylaxis reduces the risk of developing extensive chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica* 88:315-323.
55. Finke, J., Bethge, W.A., Schmoor, C., Ottinger, H.D., Stelljes, M., Zander, A.R., Volin, L., Ruutu, T., Heim, D.A., Schwerdtfeger, R., et al. 2009. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol* 10:855-864.

56. Bacigalupo, A., Lamparelli, T., Barisione, G., Bruzzi, P., Guidi, S., Alessandrino, P.E., di Bartolomeo, P., Oneto, R., Bruno, B., Sacchi, N., et al. 2006. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:560-565.
57. Lee, S.J., Vogelsang, G., and Flowers, M.E. 2003. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:215-233.
58. Akpek, G., Zahurak, M.L., Piantadosi, S., Margolis, J., Doherty, J., Davidson, R., and Vogelsang, G.B. 2001. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 97:1219-1226.
59. Carpenter, P.A. 2011. How I conduct a comprehensive chronic graft-versus-host disease assessment. *Blood* 118:2679-2687.
60. Corre, E., Carmagnat, M., Busson, M., de Latour, R.P., Robin, M., Ribaud, P., Toubert, A., Rabian, C., and Socie, G. 2010. Long-term immune deficiency after allogeneic stem cell transplantation: B-cell deficiency is associated with late infections. *Haematologica* 95:1025-1029.
61. Krenger, W., Blazar, B.R., and Hollander, G.A. 2011. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117:6768-6776.
62. Shimabukuro-Vornhagen, A., Hallek, M.J., Storb, R.F., and von Bergwelt-Baildon, M.S. 2009. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood* 114:4919-4927.
63. Flowers, M.E., Lee, S., and Vogelsang, G. 2003. An update on how to treat chronic GVHD. *Blood* 102:2312.
64. Akpek, G., Lee, S.M., Anders, V., and Vogelsang, G.B. 2001. A high-dose pulse steroid regimen for controlling active chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:495-502.
65. Messina, C., Locatelli, F., Lanino, E., Uderzo, C., Zacchello, G., Cesaro, S., Pillon, M., Perotti, C., Del Fante, C., Faraci, M., et al. 2003. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 122:118-127.
66. Malek, T.R., and Castro, I. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33:153-165.
67. Koreth, J., Matsuoka, K., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., 3rd, Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., et al. 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 365:2055-2066.
68. Boden, E.K., and Snapper, S.B. 2008. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24:733-741.
69. Glocker, E.O., Frede, N., Perro, M., Sebire, N., Elawad, M., Shah, N., and Grimbacher, B. 2010. Infant colitis--it's in the genes. *Lancet* 376:1272.
70. Glocker, E.O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E.M., Schaffer, A.A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., et al. 2009. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361:2033-2045.
71. Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 361:888-898.
72. Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D., and Banerjee, S. 2012. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 366:1190-1199.
73. Papp, K.A., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J.P., Krueger, J.G., Kricorian, G., Aras, G., Li, J., Russell, C.B., Thompson, E.H., et al. 2012. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 366:1181-1189.
74. Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., et al. 2012. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*.

75. Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J., et al. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 22:1067-1068.
76. Barnes, D.W., Loutit, J.F., and Micklem, H.S. 1962. "Secondary disease" of radiation chimeras: a syndrome due to lymphoid aplasia. *Ann N Y Acad Sci* 99:374-385.
77. Broady, R., Yu, J., Chow, V., Tantiworawit, A., Kang, C., Berg, K., Martinka, M., Ghoreishi, M., Dutz, J., and Levings, M.K. 2010. Cutaneous GVHD is associated with the expansion of tissue-localized Th1 and not Th17 cells. *Blood* 116:5748-5751.
78. Nikolic, B., Lee, S., Bronson, R.T., Grusby, M.J., and Sykes, M. 2000. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 105:1289-1298.
79. Ratajczak, P., Janin, A., Peffault de Latour, R., Leboeuf, C., Desveaux, A., Keyvanfar, K., Robin, M., Clave, E., Douay, C., Quinquenel, A., et al. 2010. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* 116:1165-1171.
80. Zhang, C., Todorov, I., Zhang, Z., Liu, Y., Kandeel, F., Forman, S., Strober, S., and Zeng, D. 2006. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* 107:2993-3001.
81. Sakoda, Y., Hashimoto, D., Asakura, S., Takeuchi, K., Harada, M., Tanimoto, M., and Teshima, T. 2007. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 109:1756-1764.
82. Zhang, Y., Hexner, E., Frank, D., and Emerson, S.G. 2007. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* 179:3305-3314.
83. Trendelenburg, M., Gregor, M., Passweg, J., Tichelli, A., Tyndall, A., and Gratwohl, A. 2001. "Altered immunity syndrome", a distinct entity in long-term bone marrow transplantation survivors? *Bone Marrow Transplant* 28:1175-1176.
84. Patriarca, F., Skert, C., Sperotto, A., Zaja, F., Falletti, E., Mestroni, R., Kikic, F., Calistri, E., Fili, C., Geromin, A., et al. 2006. The development of autoantibodies after allogeneic stem cell transplantation is related with chronic graft-vs-host disease and immune recovery. *Exp Hematol* 34:389-396.
85. Svegliati, S., Olivieri, A., Campelli, N., Luchetti, M., Poloni, A., Trappolini, S., Moroncini, G., Bacigalupo, A., Leoni, P., Avvedimento, E.V., et al. 2007. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 110:237-241.
86. Sarantopoulos, S., Stevenson, K.E., Kim, H.T., Bhuiya, N.S., Cutler, C.S., Soiffer, R.J., Antin, J.H., and Ritz, J. 2007. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 13:6107-6114.
87. Sarantopoulos, S., Stevenson, K.E., Kim, H.T., Washel, W.S., Bhuiya, N.S., Cutler, C.S., Alyea, E.P., Ho, V.T., Soiffer, R.J., Antin, J.H., et al. 2011. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 117:2275-2283.
88. Farmer, E.R. 1986. The histopathology of graft-versus-host disease. *Adv Dermatol* 1:173-188.
89. Paczesny, S., Braun, T.M., Levine, J.E., Hogan, J., Crawford, J., Coffing, B., Olsen, S., Choi, S.W., Wang, H., Faca, V., et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Transl Med* 2:13ra12.
90. Yanik, G.A., Ho, V.T., Levine, J.E., White, E.S., Braun, T., Antin, J.H., Whitfield, J., Custer, J., Jones, D., Ferrara, J.L., et al. 2008. The impact of soluble tumor necrosis factor receptor etanercept on the treatment of idiopathic pneumonia syndrome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 112:3073-3081.
91. Rozmus, J., Schultz, K.R., Wynne, K., Kariminia, A., Satyanarayana, P., Krailo, M., Grupp, S.A., Gilman, A.L., and Goldman, F.D. 2011. Early and late extensive chronic graft-versus-host disease in children is characterized by different Th1/Th2 cytokine profiles: findings of the Children's Oncology Group Study ASCT0031. *Biol Blood Marrow Transplant* 17:1804-1813.
92. Ferrara, J.L., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Holler, E., Teshima, T., Levine, J.E., Choi, S.W., Huber, E., Landfried, K., et al. 2011. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118:6702-6708.

93. Paczesny, S., Levine, J.E., Braun, T.M., and Ferrara, J.L. 2009. Plasma biomarkers in graft-versus-host disease: a new era? *Biol Blood Marrow Transplant* 15:33-38.
94. Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Vey, N., Bouabdallah, R., Stoppa, A.M., Viret, F., Gravis, G., Olive, D., and Gaugler, B. 2005. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 106:4407-4411.
95. Paczesny, S., Krijanovski, O.I., Braun, T.M., Choi, S.W., Clouthier, S.G., Kuick, R., Misek, D.E., Cooke, K.R., Kitko, C.L., Weyand, A., et al. 2009. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 113:273-278.
96. Melenhorst, J.J., Tian, X., Xu, D., Sandler, N.G., Scheinberg, P., Biancotto, A., McCoy, J.P., Hensel, N.F., Mclver, Z., Douek, D.C., et al. 2011. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuations after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*.
97. Grambsch PM, T.T. 1994. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 81:515-526.
98. Fine JP, G.R. 1999. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *Journal of the American Statistical Association* 94:496-509.
99. Flowers, M.E., Inamoto, Y., Carpenter, P.A., Lee, S.J., Kiem, H.P., Petersdorf, E.W., Pereira, S.E., Nash, R.A., Mielcarek, M., Fero, M.L., 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* 117:3214-3219.
100. Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N.O., and Stiles, J.K. 2011. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 22:121-130.
101. Piper, K.P., Horlock, C., Curnow, S.J., Arrazi, J., Nicholls, S., Mahendra, P., Craddock, C., and Moss, P.A. 2007. CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 110:3827-3832.
102. Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A.C., and Horak, I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75:253-261.
103. Bachmann, M.F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K., and Oxenius, A. 2007. Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *Eur J Immunol* 37:1502-1512.
104. Pipkin, M.E., Sacks, J.A., Cruz-Guilloty, F., Lichtenheld, M.G., Bevan, M.J., and Rao, A. 2010. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 32:79-90.
105. Budagian, V., Bulanova, E., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. 2006. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:259-280.
106. Liu, Z., Geboes, K., Colpaert, S., D'Haens, G.R., Rutgeerts, P., and Ceuppens, J.L. 2000. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 164:3608-3615.
107. Thiant, S., Yakoub-Agha, I., Magro, L., Trauet, J., Coiteux, V., Jouet, J.P., Dessaint, J.P., and Labalette, M. 2010. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 45:1546-1552.
108. Maurer, M., and von Stebut, E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-1886.
109. Zlotnik, A., and Yoshie, O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 36:705-716.
110. Ueha, S., Murai, M., Yoneyama, H., Kitabatake, M., Imai, T., Shimaoka, T., Yonehara, S., Ishikawa, S., and Matsushima, K. 2007. Intervention of MAdCAM-1 or fractalkine alleviates graft-versus-host reaction associated intestinal injury while preserving graft-versus-tumor effects. *J Leukoc Biol* 81:176-185.

111. Luft, T., Dietrich, S., Falk, C., Conzelmann, M., Hess, M., Benner, A., Neumann, F., Isermann, B., Hegenbart, U., Ho, A.D., et al. 2011. Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood* 118:1685-1692.
112. Sarantopoulos, S., Stevenson, K.E., Kim, H.T., Cutler, C.S., Bhuiya, N.S., Schowalter, M., Ho, V.T., Alyea, E.P., Koreth, J., Blazar, B.R., et al. 2009. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 113:3865-3874.
113. Martin, P.J., Weisdorf, D., Przepiorka, D., Hirschfeld, S., Farrell, A., Rizzo, J.D., Foley, R., Socie, G., Carter, S., Couriel, D., et al. 2006. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. Design of Clinical Trials Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:491-505.

Etablissement d'un score prédictif de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH) chronique extensive en allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

RESUME

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une immunothérapie efficace pour le traitement de nombreuses pathologies hématologiques malignes, les déficits immunitaires et les hémoglobinopathies sévères. De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières décennies, en particulier en ce qui concerne la diversité des sources de CSH accessibles et l'apparition de conditionnements non myéloablatifs ou d'intensité réduite permettant de proposer l'allogreffe à des sujets plus âgés (au-delà de 50 ans) ou ayant des comorbidités. Cette thérapeutique est à l'origine d'une complication majeure : la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Cette affection peut être définie comme aiguë (survenant les premiers mois) ou chronique, principale complication à moyen et long terme. La GVH chronique est une complication fréquente dont l'incidence varie entre 40 à 70% selon les séries et qui, malgré l'effet anti-tumoral associé, est à l'origine d'une morbi-mortalité importante. La physiopathologie reste cependant peu connue. Ainsi si les lymphocytes T ont un rôle central dans la GVH, les lymphocytes B et les cellules dendritiques apparaissent, au vu de récents travaux, comme ayant un rôle majeur dans cette affection. Ces différents types cellulaires entraînent une dysrégulation cytokinique dont le profil immunitaire n'est pas défini de façon univoque. Afin, d'apporter des éléments de réponse, nous avons étudié les caractéristiques cliniques à la greffe et le dosage de 41 cytokines à J100 chez 152 patients allogreffés dans le service d'Hématologie du CHU de Nantes. Notre étude s'est focalisée sur les GVH chroniques extensives en raison de l'implication thérapeutique. Deux facteurs cliniques - l'antécédent de GVH aiguë et les cellules souches périphériques comme CSH-étaient liées de façon significative à la survenue d'une GVH chronique extensive. Nous avons identifié cinq cytokines semblant correspondre à des facteurs de risque de développement d'une GVH chronique extensive : l'IP10, l'IL-10, l'IL2- α , l'IL-15 et MIP1 β et cinq cytokines qui seraient plutôt considérées comme des facteurs protecteurs : MDC, Fractalkine, RANTES, TARC et IL-12p40. Ces résultats sont en faveur d'un profil T_H1 à l'origine de cette affection. Puis nous avons déterminé une signature à J100 prédictive de la survenue d'une GVH chronique extensive et de sa sévérité. Cette signature qui comprend les deux paramètres cliniques mentionnés et cinq cytokines (MDC, IP10, TARC, Fractalkine et MIP1 β) pourrait avoir un intérêt pratique dans le suivi d'un patient allogreffé. Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés sur une cohorte externe, en cours d'évaluation, puis de façon multicentrique avant d'avoir une implication thérapeutique.

MOTS-CLES

Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques- réaction du greffon contre l'hôte (GVH)- cytokines-