



HAL
open science

Comparaison de deux doses de Sérum Anti-lymphocytaire dans l'allogreffe de Cellules souches hématopoïétiques issues de donneur non apparenté

Maud d'Aveni

► **To cite this version:**

Maud d'Aveni. Comparaison de deux doses de Sérum Anti-lymphocytaire dans l'allogreffe de Cellules souches hématopoïétiques issues de donneur non apparenté. Sciences du Vivant [q-bio]. 2011. hal-01733573

HAL Id: hal-01733573

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733573v1>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine spécialisée

par

Maud D'Aveni

Comparaison de deux doses de Sérum Anti-Lymphocytaire
dans l'allogreffe de Cellules souches hématopoïétiques issues de donneur non
apparenté

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Pierre BORDIGONI	Président
Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE	Juge
Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER	Juge
Madame le Docteur Alexandra SALMON	Juge
Madame le Docteur Danièle BENSOUSSAN	Juge

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE
Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen Mission « sillon lorrain » : Professeur Annick BARBAUD
Vice Doyen Mission « Campus » : Professeur Marie-Christine BÉNÉ
Vice Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN
Vice Doyen Mission « Recherche » : Professeur Jean-Louis GUÉANT

Assesseurs :

- Pédagogie :
- 1^{er} Cycle :
- « Première année commune aux études de santé (PACES) et universitarisation études para-médicales »
- 2^{ème} Cycle :
- 3^{ème} Cycle :
- « *DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques* »
- « *DES Spécialité Médecine Générale* »
- Filières professionnalisées :
- Formation Continue :
- Commission de Prospective :
- Recherche :
- DPC :

Professeur Karine ANGIOÏ-DUPREZ
Professeur Bernard FOLIGUET

M. Christophe NÉMOS
Professeur Marc DEBOUVERIE

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
Professeur Francis RAPHAËL
M. Walter BLONDEL
Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
Professeur Didier MAINARD
Professeur Jean-Dominique DE KORWIN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====
PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jean BEUREY
Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT
Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gabriel FAIVRE – Gérard FIEVE - Jean FLOQUET
Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ
Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET – Christian JANOT - Jacques LACOSTE
Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE
Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ - Pierre MATHIEU
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL - Jean PREVOT
Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL - Daniel SCHMITT
Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ
Gérard VAILLANT – Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====
**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIÉWSKI

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE
Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD
Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL
Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACÉ

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRINBIROULET

2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT,
GYNÉCOLOGIE OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS
HOSPITALIERS**

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteur Béatrice MARIE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Docteur Damien MANDRY

**44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET
NUTRITION**

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Nicole LEMAU de TALANCE

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIERE – Docteur Frédérique CLAUDOT

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Docteur Pierre GILLOIS – Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Docteur François SCHOONEMAN

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique))

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Docteur Patrick ROSSIGNOL

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteur Anne-Christine RAT

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT,
GYNÉCOLOGIE OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS
Madame Natalia DE ISLA – Monsieur Pierre TANKOSIC

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE

Madame Nadine MUSSE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Alain AUBREGE
Professeur associé Francis RAPHAEL
Docteur Jean-Marc BOIVIN
Docteur Jean-Louis ADAM
Docteur Elisabeth STEYER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGE
Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean FLOQUET - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeur Simone GILGENKRANTZ – Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS – - Professeur Guy PETIET
Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL
Professeur Jacques ROLAND - - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT
Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972) <i>Université de Stanford, Californie (U.S.A)</i>	Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989) <i>Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)</i>
Professeur Paul MICHIELSEN (1979) <i>Université Catholique, Louvain (Belgique)</i>	Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996) <i>Université de Pennsylvanie (U.S.A)</i>
Professeur Charles A. BERRY (1982) <i>Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)</i>	Professeur Mashaki KASHIWARA (1996) <i>Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)</i>
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982) <i>Brown University, Providence (U.S.A)</i>	Professeur Ralph GRÄSBECK (1996) <i>Université d'Helsinki (FINLANDE)</i>
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982) <i>Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)</i>	Professeur James STEICHEN (1997) <i>Université d'Indianapolis (U.S.A)</i>
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982) <i>Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)</i>	Professeur Duong Quang TRUNG (1997) <i>Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)</i>
Harry J. BUNCKE (1989) <i>Université de Californie, San Francisco (U.S.A)</i>	
Professeur Daniel G. BICHET (2001) <i>Université de Montréal (Canada)</i>	Professeur Marc LEVENSTON (2005) <i>Institute of Technology, Atlanta (USA)</i>
Professeur Brian BURCHELL (2007) <i>Université de Dundee (Royaume Uni)</i>	

REMERCIEMENTS

A notre Maître et Président de thèse,

Monsieur le Professeur P. BORDIGONI

Professeur d'Hématologie (option clinique)

Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse.

Nous avons beaucoup appris de votre enseignement et de votre expérience.

Nous vous remercions de vos conseils tout au long de notre internat.

Vous nous avez confié ce sujet pour lequel vous aviez déjà beaucoup travaillé.

Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur T. LECOMPTE

Professeur d'Hématologie Biologique

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous vous remercions pour votre enseignement au travers l'étendue de vos connaissances, toujours dans la rigueur, l'efficacité et la confiance.

Que ce travail soit l'expression de notre profonde considération.

A notre Maître et Juge

Monsieur le Professeur P. FEUGIER

Professeur d'Hématologie et de Transfusion : option hématologique (type mixte : clinique)

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous avons grandement apprécié travailler à vos côtés pendant notre internat.

Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement, vos qualités humaines, votre efficacité professionnelle, votre disponibilité mais aussi votre sens de l'humour. Nous vous témoignons une grande admiration.

Veillez trouver dans cette thèse l'expression de notre considération et de notre gratitude.

A notre Juge,

Madame le Docteur A. SALMON

Docteur en Pédiatrie

Nous vous remercions très vivement d'avoir accepté de juger cette thèse.

Nous souhaitons témoigner d'une grande admiration pour vos qualités humaines, votre grande disponibilité auprès des patients, votre rigueur dans le travail au quotidien. Nous avons beaucoup appris de votre connaissance clinique. Nous avons beaucoup apprécié le travail effectué à vos côtés imprégné d'une énergie et d'une bonne humeur infaillibles.

Nous espérons que ce travail sera le témoignage d'une immense gratitude.

A notre Juge,

Madame le Docteur D. BENSOUSSAN

Docteur en pharmacie,

Nous vous remercions très vivement d'avoir accepté de juger cette thèse.

Nous avons beaucoup apprécié découvrir l'immunologie et la recherche à vos côtés. Nous avons bénéficié de vos compétences dans ces deux domaines. Nous vous remercions pour votre confiance, votre encouragement sans relâche dans notre travail. Nous avons beaucoup apprécié vos conseils avisés, votre enseignement, votre bonne humeur, votre disponibilité.

Nous espérons que ce travail sera à la hauteur de la reconnaissance qu'il nous permet de vous témoigner.

A tous ceux qui ont participé à mon enseignement durant l'internat :

A Monsieur le Professeur LEDERLIN, Madame le Docteur Brigitte WITZ, à Monsieur le Docteur Francis WITZ, à Monsieur le Docteur Cyrille HULIN, à Monsieur le Docteur Serge BOLOGNA, à Madame le Docteur Agnès GUERCI-BRESLER, à Madame le Docteur Carla AROJAU, à Madame le Docteur Dana RANTA, à Madame le Docteur Caroline BONMATI.

Pour votre enseignement riche, rigoureux, dévoué et pour votre confiance. J'ai découvert et rapidement apprécié l'hématologie à vos côtés. Que vous voyiez ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Thierry MAY, Monsieur le Professeur Christian RABAUD, Madame le Docteur Than LECOMPTE, Madame le Docteur Sibille BEVILACQUA, Madame le Docteur Christine BURTY, Madame le Docteur Laurence BOYER, Madame le Docteur Lorraine LETRANCHANT et Monsieur le Docteur Manuel PETITFRERE.

Pour votre enseignement, votre bon esprit d'équipe.

Que vous trouviez dans ce travail l'expression de mes remerciements.

A Madame le Docteur Laurence CLEMENT,

Pour m'avoir appris la greffe avec autant de simplicité, de bonne humeur et d'énergie. Que vous trouviez en ce travail le témoignage de ma profonde admiration.

A Monsieur le Docteur Bernard CHRISTIAN, à Madame le Docteur Isabelle GUIBAUD, à Madame le Docteur Véronique DORVAUX, à Monsieur le Docteur Sorin VISANICA,

Pour votre enseignement inoubliable, pour votre confiance en moi et grâce à vous une grande prise d'autonomie, entourée de la dynamique familiale que connaît votre service.

Que vous trouviez ici l'expression de mon excellent souvenir et ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Bruno LEVY, à Monsieur le Docteur Thierry JACQUES, Madame le Docteur Sandrine BOUSSAT, Madame le Docteur Carine THIVILIER, Madame le Docteur Marie CONRAD, Monsieur le Docteur Pierre PEREZ

Pour votre enseignement théorique et pratique structuré. Pour votre pédagogie à tout moment, même les plus stressants. Pour vos encouragements et votre considération dans mes premiers pas dans la réanimation.

Que vous trouviez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Sima MATHIEU-NAFISSI, à Madame le Docteur Bénédicte DONZÉ,
Pour votre enseignement, votre disponibilité, votre bonne humeur et la merveilleuse équipe soudée qui m'a accueillie.

Que vous trouviez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A toute l'équipe du service de Thérapie cellulaire et Tissulaire de Monsieur le Professeur STOLTZ, Monsieur le Professeur Ali DALOUL et Madame le Docteur Véronique DECOT.
Pour votre enseignement, votre investissement pour rendre ce court stage le plus enrichissant possible. Que vous voyiez par ce travail le témoignage d'une grande reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE, à Monsieur le Docteur Jean-François LESESVE, à Madame le Docteur Véronique LATGER-CANNARD, à Monsieur le Docteur Sylvain SALIGNAC, à Monsieur le Docteur DEVIGNES, à Madame le Docteur Marie HACQUARD, à Madame le Docteur Birgit FROTSCHER, à Monsieur le Docteur Julien PERRIN

Pour votre enseignement vaste entre la cytologie et l'hémostase. Merci d'avoir introduit dans mon cursus des connaissances solides et d'avoir éclairci des cours si abstraits auparavant.

Aux infirmières, techniciennes, aides-soignantes, secrétaires et tous ceux travaillant au sein des services qui m'ont accueillie pendant mon internat : les secteurs 1, 2 et protégé d'hématologie adulte à Brabois, le service de maladies infectieuses (HDJ, TD7 et TD8), le STM, le service d'hématologie de Metz, la réanimation médicale à Brabois, les services d'hémaphérèse thérapeutique à l'EFS et l'UTCT au CHU, enfin l'hématologie biologique.

Merci pour votre compétence, votre esprit d'équipe toujours au service du patient et votre gentillesse.

A Monsieur le Docteur C. BAUMANN, pour l'apport de son expertise statistique dans ce travail.

A ma famille :

A papa et maman, pour votre soutien immense, votre amour et votre rigueur dans le travail. C'est grâce à vous si on est tous là aujourd'hui ! Je ne vous remercierai jamais assez.

A ma sœur, son mari et mes merveilleuses nièces qui emplissent de joie et de rires la famille.

A David, pour notre complicité, notre complémentarité, pour ton soutien inconsidéré dans tous mes projets et ta part indéniable dans leur réussite.

A la famille Piney : Michèle, Denis et Xavier.

A tous les amis d'enfance :

En particulier Agnès et Jean-Vincent, pour toutes ces années d'amitié ponctuées de DIU parisiens qui m'assuraient quelques nuits sur votre BZ...

A tout le petit groupe de promo, que les années et les kilomètres ne séparent pas :

Coralie et Manu, Makram et Oriane, Marie et Laurent, Marine et Julien, Sandrine et Pascal, Louis et Camille, Anne-Laure et Vincent, Thomas.

A tous les amis de Nancy qui m'ont chaleureusement prouvé que la Lorraine est une région où il fait bon vivre, et aussi où l'on peut skier :

A Caroline et Jérôme, pour m'avoir entouré dans mes premiers pas d'interne lorraine, m'avoir permis de me sentir comme à la maison très rapidement. Votre réconfort et votre accueil ne s'effaceront jamais.

A Cécile, pour avoir partagé ces premiers temps au GEC, nos grands fous rires sur l'ironie de la vie.

A Marguerite, pour m'avoir accueillie à bras ouvert chez toi, et pour notre amitié qui n'a cessé de grandir au fil des tisanes entre voisines.

A des co-internes et CCA qui sont devenus des amis : Alice, Anne et Guillaume, Marie et Pierre.

A Isabelle, pour ton humour, ton franc parlé et ta disponibilité, surtout pour toutes ces petites soirées ensembles.

A Philippe, pour toutes ces grandes réflexions sur l'éthique dans la médecine.

Au petit groupe cinéma du dimanche soir: Jean-Gabriel, Antoine, Laurent, Isabelle...

A ma sympathique colocation : Marie L, Hélène, Olivier, Benjamin, Aurélie...

A Lamia et Ben : après la recherche il y a la joie de vivre grâce à vous deux.

A tous mes co-internes : en particulier, Eveline, Axelle, Thio, Hélène G., Fabien, Laurence, Claire G, Maria, Félicie, Marine et Eve-marie (dites « les lapins »), Cécile et Caroline, Sandrine, Hélène S, Claire L, Yoann, Greg, Nader, Camille, Anne-Lise, Carole, Joséphine.

A tous mes amis par alliance pharmacienne...

A tout le petit groupe de Necker.

SERMENT

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire. Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément. Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés. J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

SOMMAIRE

INTRODUCTION	24
GENERALITES	25
PARTIE 1 : GENERALITES SUR L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES	
HEMATOPOIETIQUES	25
I. DEFINITION	25
A. Indications actuelles.....	25
B. Source du greffon.....	25
C. Choix du donneur.....	25
D. Conditionnement.....	26
E. Complications post-greffes	26
1/ Complications immunologiques.....	27
2/ Autres complications	27
F. Rechute.....	27
II. EFFET de la GREFFE contre la TUMEUR ou la LEUCEMIE	28
A. Antigènes cibles.....	28
1/ Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA).....	28
2/ Les protéines associées à la leucémie.....	28
3/ Les protéines du soi non-polymorphiques.....	28
4/ La perte d'expression de ligands inhibiteurs ou la surexpression de ligands activateurs des cellules NK.....	28
B. Cellules impliquées.....	29
1/ Les lymphocytes T	29
2/ Les cellules NK	30
3/ Les cellules présentatrices d'antigènes, CPA (dendritiques et les macrophages)	32
III. LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HOTE	34
A. Définition.....	34
B. Epidémiologie	34
C. Physiopathologie.....	36
1/ Mécanismes imputés dans la GVH aiguë.....	36
2/ Mécanismes imputés dans la GVH chronique.....	38
D. Manifestations cliniques	38
1/ GVH aiguë.....	38
2/ GVH chronique	39
E. Diagnostic	39
F. Thérapeutique	40
1/ Préventive.....	40
2/ Curative	40
PARTIE 2 : LA RECONSTITUTION HEMATOLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE APRES GREFFE	41
I. BASES FONDAMENTALES	41
A. Impact de la reconstitution immunitaire sur la rechute, GVL, GVH.....	41
B. Principaux acteurs du système immunitaire reconstitué.....	41
1/ L'immunité innée	41
2/ La réponse immune adaptative.....	43
II. CHRONOLOGIE.....	44
A. De J0 à 4 semaines : l'immunité innée	44

1/ Les cellules granuleuses	44
2/ Les cellules NK	45
3/ Les cellules dendritiques	46
B. Après 1 mois: l'immunité adaptative	46
1/ L'immunité humorale	46
2/ L'immunité cellulaire	48
C. Reconstitution immunitaire à long terme	49
III. FACTEURS DE RISQUE INFLUENCANT LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE	50
A. L'âge du receveur	50
B. La source du greffon	50
C. La manipulation du greffon	52
1/ La déplétion T du greffon	52
2/ Le Campath® (alemtuzumab)	52
3/ La sélection CD34+	52
D. Le conditionnement	52
E. Degré de compatibilité du greffon et maladie du greffon contre l'hôte	53
1/ Familial vs non familial	53
2/ Polymorphisme génétique des HLA et mHA	53
IV. CONSEQUENCES CLINIQUES DE LA RI	53
A. Les complications infectieuses	53
1/ Durant la période de neutropénie ($PNN < 0,5 \cdot 10^9/L$) : infections bactériennes et fongiques	53
2/ Les infections virales	54
3/ Infections micro-organismes tels que <i>Toxoplasma gondii</i> ou <i>Pneumocystis jiroveci</i> ...	56
B. GVH/GVL	56
1/ La thymopoïèse	56
2/ L'HPE : l'expansion périphérique homéostatique	57
V. TECHNIQUES D'ÉVALUATION DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE	58
A. Phénotypage lymphocytaire	58
1/ Phénotype non spécifique	58
2/ Analyses de tétramères MHC : spécificité antigénique particulière	58
B. Quantification des cercles d'excision des TCR (TREC)	59
C. Diversité du répertoire TCR	60
D. Évaluation de la capacité fonctionnelle	61
1/ Test de sécrétion de cytokines : ELISA/ELISpot	61
2/ Tests lymphoprolifératifs	62
3/ Cytotoxicité	62
PARTIE 3 : LE SERUM ANTI-LYMPHOCYTAIRE DANS L'ALLOGREFFE DE CSH	63
I. LES SERUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES en ALLOGREFFE DE CSH	63
A. Les produits commercialisés	63
B. Le SAL Frésenius	63
1/ Mécanismes d'action	64
2/ Pharmacologie	65
3/ Indications reconnues en allogreffe de CSH	66
4/ Effets secondaires	66
II. IMPACT SUR LA GVH ET GVL	66
A. Impact sur la GVH aiguë et chronique	66
1/ Les essais randomisés	66
2/ Les études comparatives non randomisées	67

B. Impact sur la GVL	69
III.IMPACT SUR LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE	69
A. Impact de la dose	69
B. Les différences selon le type de SAL	70
MATÉRIELS ET MÉTHODES	72
I. TYPE D'ETUDE.....	72
II. POPULATION ETUDIEE.....	72
A. L'échantillonnage	72
B. Prophylaxie et traitement de la GVH.....	72
C. Typage HLA	72
D. Prophylaxie infectieuse.....	73
III. ETUDE DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE.....	74
A. Etude par cytométrie en flux de la reconstitution immunitaire lymphocytaire	74
B. Etude par de la fonctionnalité de la reconstitution immunitaire lymphocytaire.....	74
IV. ANALYSE STATISTIQUE	75
RESULTATS.....	76
I. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE	76
A. En pré-greffe.....	76
1/ Âge à la greffe	76
2/ Diagnostic.....	76
3/ Délai entre le diagnostic et la greffe.....	77
4/ Groupe à risque.....	77
5/ Compatibilité HLA	77
6/ Source de greffon	77
7/ Compatibilité ABO.....	77
8/ Statut CMV donneur/receveur.....	78
9/ Sexe	78
10/ Conditionnement	78
B. En post-greffe.....	79
1/ Présence d'une maladie du greffon contre l'hôte (GVH).....	79
2/ Infections	80
3/ Survenue de cancers secondaires.....	80
4/ Survenue de la rechute.....	80
II. ETUDE DE LA MORTALITE DE NOTRE POPULATION GREFFEE.....	80
A. Survie globale	80
1/ Description de la population.....	80
2/ Impact des caractéristiques cliniques	81
3/ Impact des caractéristiques de la prise en charge	82
4/ Impact des événements post-greffe	84
B. La survie sans événement.....	84
C. Mortalité liée à la toxicité du traitement	85
1/ Mortalité liée à la toxicité du traitement.....	85
2/ Caractéristiques cliniques	85
3/ Caractéristiques de la prise en charge	86
4/ Événements post-greffe	86
D. Analyse multivariée	87
1/ Facteurs pronostiques de la survie globale à deux ans.....	87
2/ Facteurs pronostiques de la survie sans évènements à deux ans.....	87

3/ Facteurs pronostiques de la mortalité toxique à deux ans	88
III. LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE	88
A. La reconstitution immunitaire biologique	88
1/ Définition des normes biologiques	88
2/ Récupération d'un taux lymphocytaire T normal	89
3/ Récupération d'une fonctionnalité des lymphocytes circulants	92
B. Cinétique de la reconstitution immunitaire en fonction de la dose administrée de SAL... ..	98
1/ Leucocytes	98
2/ Lymphocytes	99
3/ Lymphocytes T	100
4/ Lymphocytes B	110
5/ NK	112
C. L'incidence des infections	113
1/ Facteurs explicatifs d'une infection bactérienne	113
2/ Facteurs explicatifs de la survenue d'une infection virale	115
D. L'incidence de la GVHa	117
1/ Définition	117
2/ Facteurs explicatifs	117
E. L'incidence de la GVHc	118
1/ Définition	118
2/ Facteurs explicatifs	118
F. L'incidence de la rechute	119
1/ Définition	119
2/ Facteurs explicatifs	120
3/ Événements post-greffe	121
DISCUSSION	123
I. MORTALITE	124
II. LES COMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES	125
A. Le déficit immunitaire	126
1/ Biologique	126
2/ Clinique	129
B. Les conflits immunologiques entre donneur et receveur	130
1/ Le rejet de greffe	130
2/ La maladie du greffon contre l'hôte	131
3/ La rechute	131
CONCLUSION	133

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : la non-reconnaissance du soi ou « <i>missing self</i> ».....	31
Figure 2 : Activité antitumorale des lymphocytes NK.....	32
Figure 3 : Rôles hypothétiques des différentes populations lymphocytaires dans la GVL.....	33
Figure 4 : Incidence de la GVH aiguë sévère en fonction des disparités HLA entre donneur et receveur.....	35
Figure 5 : Physiopathologie de la GVH aiguë.....	37
Figure 6 : Connexions entre réponse innée et adaptative nécessaire à la réponse anti-infectieuse et la réponse anti-tumorale.....	43
Figure 7 : Chronologie de la reconstitution immunitaire post-greffe et ses complications infectieuses.....	45
Figure 8 : Immunorégulation de la reconstitution immunitaire par le G-CSF.....	51
Figure 9 : Principe de la technique de cytométrie par tétramères.....	59
Figure 10 : Principe de réalisation d'un ELISPOT.....	62
Figure 11 : Indications d'allogreffe de CSH.....	76
Figure 12 : Survie globale à 1 an en fonction de la dose de SAL administrée aux patients.....	83
Figure 13 : Survie globale à 2 ans en fonction de la dose de SAL administrée aux patients.....	83
Figure 14 : Courbe de la survie globale à 2 ans.....	84
Figure 15 : Courbe de la survie sans évènement à 2 ans.....	85
Figure 16: Reconstitution du taux de leucocytes circulants.....	98
Figure 17 : Reconstitution du taux de lymphocytes circulants.....	99
Figure 18 : Reconstitution du taux de lymphocytes T circulants.....	100
Figure 19 : Reconstitution du taux de lymphocytes T $\alpha\beta$ circulants.....	101
Figure 20 : Reconstitution du taux de lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants.....	101
Figure 21 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 circulants.....	102
Figure 22 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 CD28+ circulants.....	103
Figure 23 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 CD38+ circulants.....	103
Figure 24 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 HLA-DR+ circulants.....	104
Figure 25 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 naïfs circulants.....	105
Figure 26 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 mémoires circulants.....	105
Figure 27 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 circulants.....	106
Figure 28 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 CD28+ circulants.....	107
Figure 29 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 CD38+ circulants.....	107
Figure 30 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 HLA-DR+ circulan.....	107
Figure 31 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 naïfs circulants.....	108
Figure 32 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 mémoires circulants.....	109
Figure 33 : Reconstitution du taux de lymphocytes NKT circulants.....	110
Figure 34 : Reconstitution du taux de lymphocytes B circulants.....	111
Figure 35 : Reconstitution du taux de lymphocytes NK circulants.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Comparaison de la population étudiée dans le groupe ayant bénéficié de 40mg/kg de SAL versus le groupe ayant reçu 90mg/kg de SAL.	79
Tableau II : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la survie globale.	87
Tableau III : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la survie sans évènement.	88
Tableau IV : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la mortalité par toxicité du traitement.	88
Tableau V : Facteurs pronostics de la reconstitution immunitaire évaluée par la normalité des taux de cellules mononuclées circulantes sanguines.	96
Tableau VI : Facteurs pronostics de la reconstitution immunitaire fonctionnelle.	97
Tableau VII : Analyse multivariée des facteurs influençant les conflits immunologiques.	121
Tableau VIII : Comparaison du devenir de la population ayant reçu 40mg/kg de SAL versus la population ayant reçu 90mg/kg de SAL.	122

ABRÉVIATIONS

ADCC : cytotoxicité dépendante de l'anticorps (*Antibody dependant cellular cytotoxicity*)
AICD : induction d'apoptose sur les cellules activées (*activation-induced cell death*)
BCR : récepteur du LB de type immunoglobuline de surface (*B cell receptor*)
CD : Antigènes de surface appelés *cluster of differentiation*
CDR: *Complementary Determining Region*, region variable d'un TCR ou BCR.
CMV : Cytomégalovirus
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CPM : coups par minute
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CSP : Cellules souches périphériques
CTL : Lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T lymphocyte*)
DC : Cellules dendritiques (*Dendritic cells*), *mDC (myeloid Dendritic cells)*,
pDC (plasmacytoid Dendritic cells)
DFS: survie sans rechute (*Disease Free survival*)
DLI: injection de lymphocytes du donneur (*Donor Lymphocyte Infusion*)
EBV : Virus Epstein-Barr
EFS : Survie sans événement (*Event free survival*) équivalent de DFS (*disease free survival*)
G-CSF: Granulocyte colony stem factor
GITMO: groupe italien de transplantation de moelle osseuse (*Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osso*)
GVH : Réaction du greffon contre l'hôte (*Graft versus host*)
GVHa : Réaction aiguë du greffon contre l'hôte
GVHc : Réaction chronique du greffon contre l'hôte
GVL : Réaction du greffon contre la leucémie (*Graft versus leukemia*)
GVT : Réaction du greffon contre la tumeur (*Graft versus Tumor*)
HPE : expansion périphérique homéostatique (*Homeostatic peripheric expansion*)
HR : Hazard ratio
HHV6 : 6^{ème} Herpès virus humain (*Human herpes virus*)
HLA : Complexe majeur d'histocompatibilité de l'Homme (*Human leucocyte antigene*)
HSV : Virus Herpès simplex
IC : Intervalle de confiance
IFN γ : Interféron gamma
IL : interleukins
IT: index de transformation
KGF : Keratinocyte Growth Factor
LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
LB : Lymphocyte B
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LMC : Leucémie myéloïde chronique
LMMCJ : Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile
LMNH : Lymphome malin non hodgkinien
LPS : lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T
MA : myéloablatif

MAT : Microangiopathie thrombotique
MVO : Maladie veino-occlusive
mHA : minor Histocompatibilité Antigen
n : nombre de patients
NK: lymphocyte Natural Killer
NKT: lymphocyte Natural Killer T
NMA : (conditionnement) non myéloabaltif
NOD : récepteur cytosolique de l'immunité innée (*cytosol nucleotide-binding oligomerization domain*)
NS : non significatif
OS : Survie globale (*overall survival*)
p : Puissance statistique du test
PNN : Polynucléaire Neutrophile
PHA : Phytohemagglutinine
PMA iono : Phorbol merystate acetate ionomycine
PTLD : post-transplantation lymphoproliférative disorders
RAG enzyme: *Recombination Activating gene enzyme*, enzyme de recombinaison des gènes du TCR et BCR.
RI : reconstitutio immunitaire
SAB : sérum AB
SAL : Sérum anti-lymphocytaire
SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SMD : syndrome myélodysplasique
SMP : Syndrome myéloprolifératif
TCR : T cell receptor
TEC: Cellules épithéliales thymiques (*Thymic epithelial cells*)
TH1 et TH2 : LT4 orienté vers une réponse cytotoxique (1) ou humorale (2) (*helper1 et helper2*)
TLI : Irradiation centrée sur les organes lymphoïdes (*total lymphoid irradiation*)
TLR : récepteur de l'immunité innée (*Toll like receptor*)
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
TRM : Mortalité liée à la toxicité du traitement (*Toxicity related mortality*)
TREC : *T Cell Receptor Excision Circles*, cercle d'excision épisomale du gène du TCR.
TTL : Test de Transformation lymphoblastique
VZV : Virus varicelle-zona

INTRODUCTION

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est à l'heure actuelle le seul traitement curatif de nombreuses hémopathies malignes, certaines tumeurs solides, nombreuses hémoglobinopathies et déficits immunitaires. Le greffon contient des cellules souches hématopoïétiques mais aussi des lymphocytes T (LT) matures du donneur. L'effet bénéfique des LT sur la bonne prise de greffe, la reconstitution immunitaire du receveur et l'effet anti-tumoral (graft versus leukemia, GVL) est contrebalancé par un effet néfaste majeur : la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) compliquée d'une morbi-mortalité élevée. Cette complication s'observe particulièrement lorsque la greffe est réalisée avec des CSH issues de donneur non apparenté avec une incompatibilité HLA. Pour limiter l'incidence de la GVH dans ces greffes, nombreux traitements immunosuppresseurs, notamment l'administration de Sérum Anti-Lymphocytaire (SAL) lors du conditionnement du receveur ont permis de réduire l'incidence et la sévérité de la GVH. Cependant, à l'heure actuelle, est débattue la question de la dose optimale de SAL à administrer. Selon les études, à des doses élevées, le SAL pourrait effectivement diminuer l'incidence de la GVH aiguë et chronique sévères mais favoriser la rechute par diminution de l'effet GVL. Nombreux centres ont constaté qu'une forte dose de SAL, de façon inattendue, augmente la mortalité par toxicité du traitement (TRM) du fait d'infections opportunistes fatales. C'est dans ce contexte de la littérature que nous avons voulu comparer deux doses de SAL (Fresenius) dans une étude rétrospective menée au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy. Nous avons étudié tout d'abord la reconstitution immunitaire pour déterminer l'impact de la dose de SAL sur l'incidence des infections. Dans un second temps, nous avons pris en compte l'impact sur la survie du receveur et sur tous les conflits immunologiques d'une allogreffe (rechute, rejet, GVH, infections...).

GENERALITES

PARTIE 1 : GENERALITES SUR L'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

I. DEFINITION [1]

A. Indications actuelles

Initialement réservée aux hémopathies malignes (les leucémies aiguës, la myélodysplasie), les indications de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) se sont peu à peu élargies aux lymphomes et tumeurs solides, à des pathologies non malignes (aplasie médullaire, hémoglobinopathies), des déficits immunitaires, certaines maladies métaboliques voire certaines maladies congénitales comme la leucodystrophie métachromatique ou l'ostéopétrose. Elle a pour but d'éradiquer le clone malin dans les hémopathies malignes : par myélo-ablation du receveur lors du conditionnement puis par réaction immunologique des lymphocytes T du donneur contre les cellules de l'hôte [2]. Dans les autres cas, il s'agit schématiquement de remplacer une moelle déficiente par une autre moelle fonctionnelle ou apporter un système immunitaire compétent.

B. Source du greffon

Un greffon peut provenir de 3 sources : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang placentaire.

C. Choix du donneur

Les allogreffes sont réalisées :

- Pour 30 % à partir de cellules souches hématopoïétiques prélevées chez un frère ou une sœur du patient, HLA compatible (greffe géno-identique).
- Pour les patients restants, une allogreffe peut être envisagée à partir d'un donneur non apparenté. Dans un peu plus de 90% des cas, le greffon est prélevé chez un volontaire sain, inscrit sur un fichier. Une allogreffe entre un donneur non apparenté et un receveur est caractérisée par le degré de compatibilité pour les antigènes HLA de classe I (A, B et C) et de classe II (DR, DQ) qui doit être au minimum de 8/10.

Cette compatibilité conditionne les complications immunologiques post-greffe et donc le pronostic des patients greffés. Dans environ 5% des cas, on a recours à une greffe de sang placentaire.

D. Conditionnement

Il existe deux types de conditionnement. Le conditionnement myéloablatif (MA) obéit théoriquement à deux objectifs : l'immunosuppression de l'hôte (nécessaire à la prise du greffon), et la destruction des cellules hématopoïétiques de l'hôte, permettant d'assurer la vacuité médullaire et de détruire un éventuel clone malin. Ce conditionnement est à la fois immunosuppresseur et myélotoxique. La soumission à ces impératifs n'a pas la même importance selon les indications de la greffe et selon le degré de compatibilité HLA entre donneur et receveur.

Le conditionnement non myéloablatif (NMA) se base sur le principe que la destruction de la moelle du receveur par le conditionnement n'est pas indispensable à la prise de greffe qui pourrait être assurée par les lymphocytes alloréactifs du donneur. Ainsi, l'effet anti-tumoral, ou l'effet du greffon contre la leucémie (GVL) plus que le conditionnement va permettre l'allogreffe. Ce conditionnement a pour avantage une moindre toxicité et peut être proposé à des patients plus âgés et/ou plus fragiles.

Le choix entre les deux conditionnements dépend de: la maladie initiale, l'état clinique du receveur, et le degré de compatibilité HLA entre donneur et receveur.

E. Complications post-greffes

L'allogreffe s'accompagne schématiquement d'une morbi-mortalité secondaire à la toxicité du conditionnement, à la réaction du greffon contre l'hôte ou « *graft versus host disease* » (GVH) et au déficit immunitaire post-greffe. L'incidence et la gravité de ces complications dépendent à la fois de paramètres propres au receveur (âge, statut de l'hémopathie) et des modalités de la greffe (type de conditionnement, compatibilité HLA entre donneur et receveur, prophylaxie de la GVH, source du greffon). On déplore des complications immunologiques ou d'autres types.

1/ Complications immunologiques

La première cause de morbi-mortalité post-greffe à l'heure actuelle est la GVH. A l'inverse, le problème du rejet touche moins de 10% des greffés car le greffon de cellules souches hématopoïétiques est injecté chez un receveur profondément immunodéprimé [3]. La seconde complication post-greffe et la reconstitution immunitaire lente qui favorise les infections opportunistes (le non soi). Cette reconstitution immunitaire lente favorise aussi les cancers par la baisse de l'immunosurveillance (soi modifié). La GVH, par son mode d'action mais aussi par l'utilisation d'immunosuppresseurs forts pour la juguler, va d'autant plus ralentir la reconstitution immunitaire. Le receveur est alors soumis à tout type d'infection pour laquelle le système immunitaire spécialisé est déficient.

2/ Autres complications

Les complications précoces comprennent :

- la maladie veino-occlusive (MVO)
- la microangiopathie thrombotique (MAT)
- les pneumopathies interstitielles (fréquemment associées à un syndrome de détresse respiratoire aiguë SDRA)
- les complications neurologiques

Les complications tardives sont : les néoplasies secondaires. Puis d'autres complications peuvent être citées : oculaires (cataracte), endocriniennes (thyroïdiennes, gonadiques, retard de croissance).

F. Rechute

La plupart des rechutes surviennent dans les 2 ans qui suivent la greffe, sur les cellules de l'hôte. La maladie du greffon contre l'hôte aiguë puis chronique témoigne d'un combat immunologique permanent contre la persistance de cellules leucémiques résiduelles après le conditionnement. Ainsi les facteurs favorisant la rechute sont : une greffe en phase avancée de la maladie, mais surtout une prophylaxie de la GVH comportant une T déplétion *ex vivo* et l'absence de GVH. La prise en charge de la rechute est différente en fonction du moment de survenue par rapport à la greffe et de l'importance de cette rechute (moléculaire, caryotypique, hématologique ou clinique). L'injection de lymphocytes du donneur a transformé leur pronostic.

II. EFFET de la GREFFE contre la TUMEUR ou la LEUCEMIE

L'allogreffe a amélioré la survie sans événement des patients atteints d'hémopathies malignes du fait de la réponse allo-immune du donneur sur les cellules malignes : l'effet *Graft versus Leukemia* (GVL) ou *Graft versus Tumor* (GVT).

A. Antigènes cibles

1/ Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA)

Si les antigènes cibles restent pour la plupart inconnus à l'heure actuelle, différents arguments indiquent le rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité :

- l'incidence de rechute augmentée en cas de greffes syngéniques par rapport aux greffes allogéniques [4]
- la GVH est associée à une moindre rechute : le caractère immunogène des mHA permettrait une activation des LT du donneur, provoquant la GVL et la GVH [5].

La reconnaissance d'un mHA sélectivement exprimé par les cellules hématopoïétiques induirait un effet GVL sans GVH; celle d'un mHA largement exprimé (cellules hématopoïétiques et épithéliales) induirait une GVH et/ou un effet GVL.

2/ Les protéines associées à la leucémie

Il s'agit d'antigènes tumoraux comme la protéine de fusion BCR-ABL.

3/ Les protéines du soi non-polymorphiques

Certains antigènes de différenciation hématopoïétique sont surexprimés par les cellules leucémiques (comme la protéinase 3). Ils sont présentés sur les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) du donneur ou du receveur par le CMH I aux LT CD8⁺ du donneur et le CMH II aux LT CD4⁺ du donneur. Leur existence contribuerait ainsi aux réactions GVL observées en l'absence de GVH.

4/ La perte d'expression de ligands inhibiteurs ou la surexpression de ligands activateurs des cellules NK

La perte d'expression des molécules du soi (CMHI) par les cellules leucémiques déclenche la cytotoxicité des cellules NK du fait de la disparition du signal inhibiteur des NK. Notons que la

cellule tumorale peut exprimer des molécules du stress qui vont au contraire activer la cellule NK contre sa cible (voir ci-dessous).

B. Cellules impliquées

Les lymphocytes T (auxiliaire CD4+ et suppresseur CD8+), les lymphocytes NK et NKT, les macrophages et les cellules dendritiques sont impliqués dans l'effet GVL. Leurs implications respectives varient en fonction de la nature de l'antigène cible. Les lymphocytes T8 et NK jouent un rôle majeur dans l'élimination par cytotoxicité des cellules tumorales.

1/ Les lymphocytes T

L'effet GVL dépend principalement de l'expansion périphérique des lymphocytes T du greffon. Une déplétion des lymphocytes T matures du greffon réduit fortement l'effet GVL. Ainsi, une injection de lymphocytes T du donneur ou DLI (*Donor Lymphocyte Infusion*), a été réalisée chez un patient atteint de leucémie myéloïde chronique (LMC) en rechute après allogreffe de CSH. Il s'avère que la DLI est composée de différents clones de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de la LMC puisqu'elle a permis sa mise en rémission [6].

a. Les LT CD8+ (LT8)

Par la reconnaissance d'un allo-peptide présenté sur une molécule HLA I de la CPA, les LT8 sont initiés à la réponse allogénique. Après reconnaissance de ce même signal sur une cellule allogénique au système hématopoïétique greffé, ces LT8 deviennent effecteurs cytotoxiques.

b. Les LT CD4+ (LT4)

Par la reconnaissance d'un allopeptide présenté par une molécule HLA II sur la CPA les LT4 sont initiés à la réponse allogénique. *In vitro*, les clones de LT4 pourvus d'un effet cytotoxique sont capables de supprimer la formation de colonies de cellules leucémiques. Mais ils sont surtout producteurs de cytokines aux effets divers, telles que l'IL-2 et l'IL-12 pour le recrutement et l'activation des LT8 et des NK. Ils sécrètent aussi l'IFN γ et le TNF α qui ont un effet direct par l'inhibition des cellules tumorales, ou un effet indirect via les LT8 par la surexpression de leurs ligands de mort. Les lymphocytes T4 seraient les principaux acteurs de l'effet GVL car la déplétion des LT8 en vue de diminuer la GVH altérerait peu la GVL [7].

c. Les cellules iNKT

Les lymphocytes NKT expriment concomitamment un TCR et un marqueur NK (le CD16). Au sein de cette population, les NKT invariants sont caractérisés par une chaîne alpha invariante du TCR (V α 24J α 18) qui leur confère la capacité à reconnaître des glycolipides, comme l'antigène glycolipidique α -galactosylcéramide (α -GalCer) présenté par des molécules CD1d [8-9]. Ce glycolipide induit une activation rapide et massive des iNKT qui produisent alors des cytokines (IL-4 et l'IFN- γ) et peuvent réguler, influencer d'autres cellules du système immunitaire et orienter la réponse immune vers la tolérance ou une réponse cytotoxique, notamment anti-tumorale [10-12]. Chez la souris il a été suggéré que les lymphocytes iNKT, en tant que puissants immunomodulateurs, pouvaient contrôler la GVH aiguë sans altérer l'effet GVL après allogreffe de CSH [13].

2/ Les cellules NK

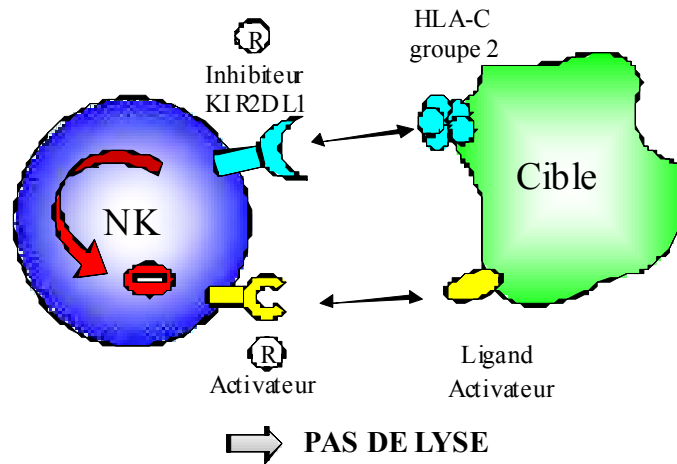
Les NK contribuent à provoquer la lyse des cellules tumorales selon deux voies :

1) l'ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) : le récepteur Fc γ R (CD16) à la surface des NK fixe les immunoglobulines G qui opsonisent les cellules tumorales et ainsi déclenche la cytotoxicité de la cellule NK vis-à-vis de cette cellule tumorale [14].

2) la non-reconnaissance du soi ou « *missing-self* » (figure 1) : les NK reçoivent un signal négatif de l'interaction de leurs récepteurs inhibiteurs avec le HLA-I (une cellule du soi), et un signal positif provoqué par l'engagement des récepteurs activateurs reconnaissant le soi modifié ou le non-soi. Si ces 2 signaux (inhibiteur, activateur) sont de même intensité, la cellule NK reste quiescente. Cependant, si la cible perd l'expression de HLA I (par exemple dans certaines tumeurs) l'engagement des récepteurs activateurs n'est plus neutralisé et la cellule cible est détruite par cytotoxicité. Dans les greffes haplo-identiques, une inadéquation dans le couple récepteur inhibiteur des NK du donneur / HLA I du receveur peut être observée, et générer une population de cellules NK capables de lyser les cellules hématopoïétiques du receveur.

3) la surexpression de soi modifié à la surface des cellules tumorales (comme les molécules exprimées en cas de stress type MIC-A, MIC-B) va engendrer un signal activateur supérieur au signal inhibiteur et déclencher la cytotoxicité du NK (figure 2).

A- Situation autologue



B- Situation allogénique avec un non-appariement KIR/HLA-C

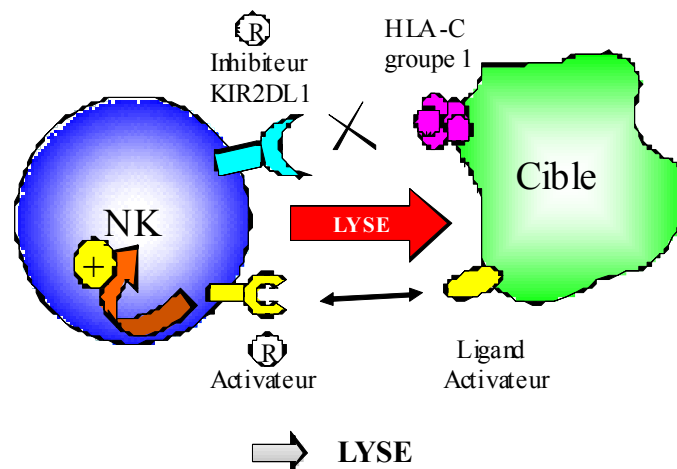


Figure 1 : la non-reconnaissance du soi ou « *missing self* », d'après Immunobiology 7^{ème} édition, Garland Science 2008.

A. En situation autologue le signal qui inhibe l'activation du lymphocyte NK contre-balance le signal qui active le lymphocyte NK. Il en résulte l'absence de déclenchement de la cytotoxicité.

B. En situation allogénique, lorsque le récepteur inhibiteur ne reconnaît plus le HLA, le signal inhibiteur du NK est aboli et ne contre-balance plus le signal activateur. Il en résulte une lyse de la cellule cible.

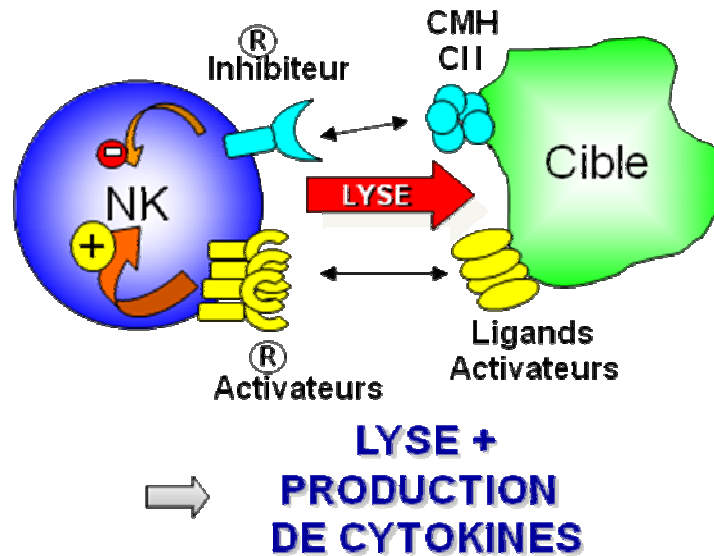


Figure 2 : Activité antitumorale des lymphocytes NK d'après Immunobiology, 7^{ème} édition, Garland Science 2008.

La lyse de la cellule cible est consécutive à la surexpression à sa surface de ligands activateurs de la cellule NK dépassant le seuil du signal inhibiteur par reconnaissance du HLA de classe I.

Les NK alloréactifs peuvent aussi tuer les cellules dendritiques du receveur, diminuant l'incidence de la GVH [15] et éliminer les cellules hématopoïétiques du receveur améliorant la prise de greffe [16].

3/ Les cellules présentatrices d'antigènes, CPA (dendritiques et les macrophages)

Les cellules dendritiques et les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes, modulatrices de l'effet GVL. Elles présentent aux lymphocytes T les peptides tumoraux sur le HLA accompagnés de signaux de co-stimulation, et ainsi amorcent l'activation des LT vis-à-vis de ce peptide [17]. Les cellules T immunocompétentes du donneur peuvent reconnaître les complexes HLA-antigènes présentés par :

- les CPA du donneur (reconnaissance indirecte)
- les CPA du receveur (réaction croisée de la reconnaissance directe).

Une étude récente dans un modèle murin a mis en évidence l'importance du maintien d'un état de chimérisme mixte plutôt que complet par la contribution des CPA du receveur dans la survenue d'un effet GVL sans GVH sévère [18].

Initiation de la réponse allo-immune:

Activation des LT via
CMH classe I pour les LTS
CMH classe II pour les LT4

Présentation directe via les
cellules leucémiques

Phase d'expansion clonale

De quelques semaines
à plusieurs mois

Phase effectrice

Cytotoxicité par les
lymphocytes effecteurs
activés

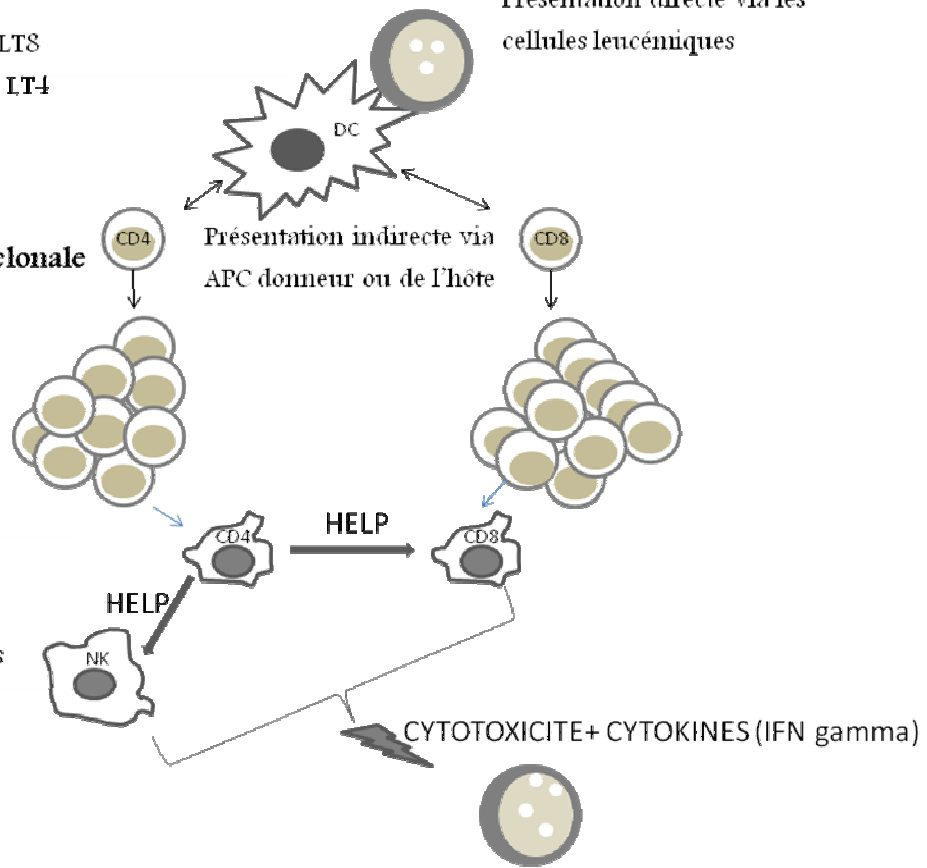


Figure 3 : Rôles hypothétiques des différentes populations lymphocytaires dans la GVL [19]

Initiation de la réponse anti-tumorale: la CPA (une DC) présente des peptides tumoraux ou des mHA... apprêtés sur le CMH (signal 1 d'activation des LT) et des molécules de co-stimulation (signal 2 d'activation des LT) et sécrètent nombreuses cytokines (signal 3)

Les LT totalement activés entrent en prolifération, deviennent blastiques et effecteurs. Les LT4 sécrètent des cytokines de type TH1 pour favoriser la réponse cellulaire cytotoxique essentiellement médiée par les NK et les LT CD8 appelés alors CTL (*Cytotoxic T lymphocyte*).

III. LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HÔTE

A. Définition

Un greffon hématopoïétique comprend des cellules souches capables de reconstituer durablement l'hématopoïèse, et des cellules immunocompétentes susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger. La problématique de la GVH est une mortalité et une morbidité élevées à court et long terme (TRM, *Transplantation related Mortality*), même si elle améliore la survie sans rechute (DFS, *Disease Free Survival*, la survie sans rechute post-greffe). Le transfert des cellules immunocompétentes permet aussi :

- La reconstitution immunitaire du receveur et donc diminue le risque d'infections opportunistes liées à l'immunodépression.
- Un effet anti-tumoral par l'effet du greffon contre la leucémie ce qui explique l'intérêt des DLI.
- La prévention du rejet de greffe en attaquant le système immunitaire de l'hôte.

On distinguait classiquement la GVH aiguë survenant moins de 100 jours après la greffe, et la GVH chronique survenant plus de trois mois après la greffe [20]. Cette définition n'est pas satisfaisante puisque la GVH aiguë et la GVH chronique ont des présentations cliniques et une physiopathologie différentes. La récente classification consensus du *National Institutes of Health* distingue une GVH aiguë de présentation tardive (après J100), et un « *overlap syndrome* » qui correspond à la présentation concomitante d'une GVH chronique et aiguë [21]. La GVH aiguë se manifeste classiquement dans les 20/40 jours post greffe et plus tard lors de conditionnement atténué. La GVH chronique est : soit progressive (extension de la GVH aiguë), soit quiescente (après un intervalle libre) soit *de novo* (non précédée de GVH aiguë) [22].

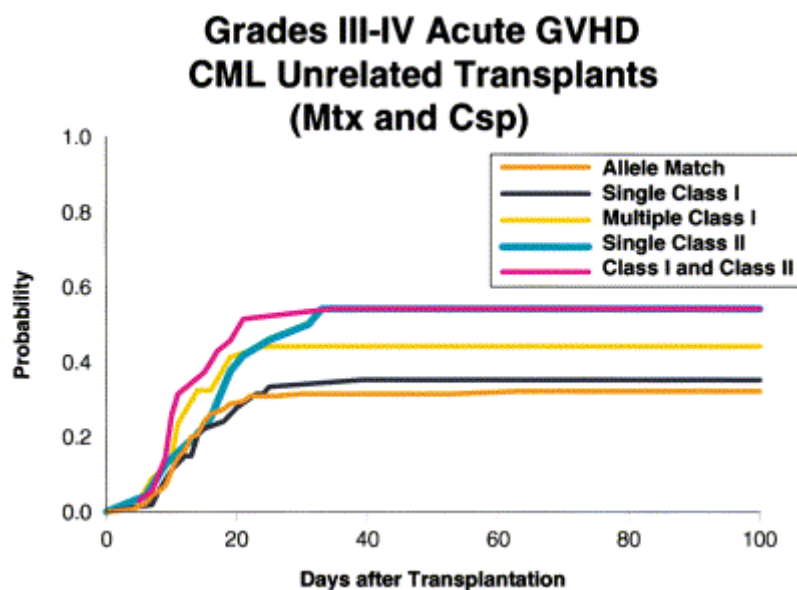
B. Epidémiologie

Selon les séries, 20 à 60% des patients adultes allogreffés à partir d'un donneur HLA-identique apparenté présentent une GVH aiguë. Un tiers des malades atteints de GVH aiguë meurt de ses conséquences directes ou indirectes. La mortalité peut atteindre jusqu'à 90% des patients greffés atteints de GVH aiguë de grade III. Les allogreffes non apparentées de patients adultes sont compliquées, selon les séries, de 45 à 80% de GVH aiguë [23].

Les facteurs favorisants sont :

- L'âge élevé du receveur

- Le sexe féminin du donneur de part son allo-immunité acquise. De plus les antigènes mineurs codés par les gènes du chromosome Y sont présentés par une petite fraction du complexe majeur d'histocompatibilité des cellules du receveur homme. Le groupe d'allogreffés « receveur de sexe masculin/donneur de sexe féminin » présente un plus faible taux de rechute, et un plus fort taux de GVH.
- L'intensité du conditionnement. La mort des cellules saines à renouvellement rapide (peau, muqueuse, tube digestif) permet le relargage d'antigènes, de cytokines... à la base de l'initiation et l'intensité de la GVH aiguë [24].
- La disparité HLA (figure 3). Depuis les techniques récentes de biologie moléculaire pour typer le HLA et trouver la meilleure compatibilité donneur/receveur, mais aussi depuis les progrès en termes de prophylaxie de la GVH, l'incidence de la GVH aiguë de sévère (grade II à IV) n'est pas accrue en greffe non apparentée HLA compatible 10/10 comparativement à une greffe géno-identique. Par contre, plus il y a de disparité HLA, plus l'incidence de la GVH aiguë augmente [25]. La GVH peut survenir lors d'une greffe intra-familiale HLA compatible sur la base de la disparité des antigènes mineurs d'histocompatibilité [26].



**Figure 4 : Incidence de la GVH aiguë sévère en fonction des disparités HLA entre donneur et receveur [27]
Plus il ya de disparité HLA plus l'incidence de la GVH aiguë sévère est importante.**

La GVH chronique globale atteint selon les études 25-35% des patients greffés en géno-identique contre 50% des patients greffés en phéno-identique (greffe non apparentée).

Quand le recours est fait à une greffe de sang placentaire, le degré de compatibilité est exigé à 4/6 au minimum, pour obtenir les mêmes résultats en terme de rejet et de GVH qu'une allogreffe non apparentée de moelle ou de CSP.

-Le type de greffon. L'incidence de la GVH aiguë de grade II à IV est d'environ 45% en cas de greffon de moelle osseuse versus 58% en cas de cellules souches périphériques. Cette différence significative se retrouve pour la GVH chronique : 42% en cas de greffon de moelle, versus 56% en cas de CSP [28]. L'incidence de la GVH aiguë de grade II à IV dans les greffes de sang placentaire comparées aux greffes de moelle osseuse est discrètement inférieure mais l'incidence de la GVH chronique semble la même [29].

C. Physiopathologie

La physiopathologie de la GVH est complexe et encore incomplètement connue.

1/ Mécanismes imputés dans la GVH aiguë

On décrit schématiquement trois phases (figure 5) [30] :

Première phase : durant le conditionnement, des lésions tissulaires de l'épithélium et de l'endothélium aboutissent à la sécrétion par les cellules de l'hôte de cytokines de l'inflammation telles que le *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) et les interleukines (IL-1...). Ces cytokines entraînent une surexpression des molécules d'adhésion et du CMH (responsables de la reconnaissance des antigènes majeurs et mineurs de l'hôte par les cellules immunitaires du donneur notamment les LT sur les CPA).

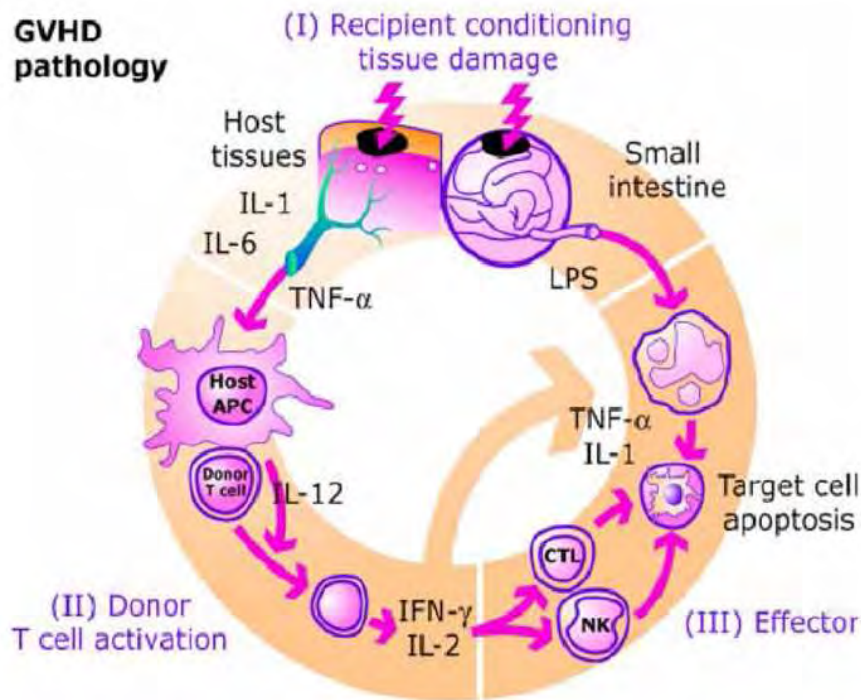


Figure 5 : Physiopathologie de la GVH aiguë [30]

La phase 1, due au conditionnement, est inflammatoire ; elle est caractérisée par un relargage massif de lipopolysaccharide (LPS) au niveau de l'épithélium intestinal endommagé. La phase 2 correspond à l'activation des CPA du donneur et du receveur, ainsi que les lymphocytes allo-réactifs dans ce contexte inflammatoire. La phase 3 est une phase effectrice des LT allo-réactifs vis-à-vis des cellules cibles (tube digestif, foie, peau).

Deuxième phase : Les allo-antigènes, une fois apprêtés sur le CMH, sont présentés par les CPA aux lymphocytes T du donneur. Les antigènes présentés par le CMH de classe I activent les lymphocytes T8, ceux présentés par le CMH de classe II activent les lymphocytes T4 (signal 1). Ce premier contact antigènes/récepteur du lymphocyte T n'aboutit à une activation du lymphocyte T que lorsque les molécules de co-stimulation sont en jeu (signal 2). Ces interactions entraînent des modifications biochimiques intracellulaires conduisant à une activation de protéines kinases C et de tyrosine kinase, et ainsi à la transcription des gènes de prolifération comme celui de l'IL2. Les cytokines produites en réponse à une stimulation par des allo-antigènes sont principalement de type TH1, c'est-à-dire les cytokines de :

- l'activation, l'expansion et la différenciation lymphocytaire T du donneur avec acquisition de la cytotoxicité
- l'activation des cellules phagocytaires de l'hôte et du donneur
- la réponse NK du donneur.

Troisième phase : Les lymphocytes T et les lymphocytes NK induisent l'apoptose des cellules cibles par toxicité directe des cytokines sécrétées ou par la voie granzyme-perforine ou la voie fas/fas ligand (ligand de mort/récepteur de mort).

2/ Mécanismes imputés dans la GVH chronique

La GVH chronique peut apparaître au décours d'une GVH aiguë soit immédiatement, soit après un intervalle libre. Dans 30 % des cas, elle peut également survenir *de novo*, c'est-à-dire sans antécédent de GVH aiguë. La GVH chronique, comme la GVH aiguë, est induite par les lymphocytes T présents dans l'inoculum du donneur. Outre des phénomènes d'allo-immunité, il semble exister dans la GVH chronique des phénomènes d'auto-immunité avec des réactions des lymphocytes T du donneur contre des antigènes présents aussi bien chez l'hôte que chez le donneur [31]. Ainsi, il a été mis en évidence des anticorps anti-plaquettes, anti-érythrocytes, anti-kératinocytes, anti-muscle lisse, anti-cytosquelette ou antinucléaires. D'autre part, les caractères cliniques de la GVHc sont proches de certaines maladies auto-immunes. Des études expérimentales et cliniques semblent indiquer l'apparition, lors de GVHc, d'une atrophie thymique et d'une perte de la fonction sécrétoire de l'épithélium thymique. S'installe une thymopoïèse aberrante caractérisée par l'absence de destruction des clones LT autoréactifs [32-33]. D'un point de vue clinique, une diminution des taux de rechutes est observée chez les patients atteints de GVHc [34]. Cependant, les décès rencontrés lors de GVHc sévère sont souvent liés à des complications infectieuses. Ainsi, la combinaison des effets positifs et négatifs de la GVHc la rend difficile à contrôler

D. Manifestations cliniques

1/ GVH aiguë

La GVH aiguë atteint surtout la peau sous forme d'un érythème morbilliforme, plus ou moins prurigineux, prédominant sur le visage, les faces d'extension des membres, les paumes et moins souvent le thorax. Son évolution se fait vers la confluence des lésions qui deviennent pourpres. Le stade avancé est caractérisé par un décollement provoqué (signe de Nikolsky) localisé puis diffus, voire un décollement spontané (épidermolyse). Le deuxième organe le plus touché est le tube digestif, avec une symptomatologie très polymorphe et peu spécifique : nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée aqueuse ou hémorragique. Enfin, l'atteinte

hépatique se manifeste plus sur le plan biologique (cytolyse et surtout cholestase sans insuffisance hépato-cellulaire) [35].

2/ GVH chronique

Dans la forme chronique, le tableau clinique est d'un grand polymorphisme en raison de la multiplicité des organes cibles possibles. Elle peut mimer des maladies auto-immunes telles que la sclérodémie, le syndrome sec de Gougerot-Sjögren et la cirrhose biliaire primitive. Les organes les plus souvent atteints sont : la peau, la cavité oropharyngée, le foie, les yeux, l'œsophage et les voies respiratoires supérieures. L'intestin grêle, le poumon, les muscles le sont plus rarement. Les mécanismes conduisant à la fibrose sont mal connus ; dans la peau, les lymphokines sécrétées par les lymphocytes T activeraient les mastocytes, ceux-ci induisant à leur tour la production de collagène par les fibroblastes [36].

E. Diagnostic

En fonction du nombre et de la sévérité des localisations de la maladie, on classe la GVH aiguë en quatre grades, décrits par Glucksberg [37] (annexe 1).

La GVH chronique a été longtemps classée en forme limitée et extensive [38] (annexe 2), pour orienter la thérapeutique. Depuis 2003, l'équipe d'Akpek *et al.* a rapporté l'existence de trois facteurs de risque associés au pronostic : atteinte cutanée extensive, thrombocytopenie, début progressif. Ainsi les patients atteints de GVH chronique sont classés en trois groupes selon leur score de pronostic : favorable, intermédiaire et haut risque. Plus récemment, la classification consensus [21] a décrit la GVH chronique selon une nouvelle méthode de score prenant en compte l'impact fonctionnel. Un score pour chaque organe est attribué selon la sévérité de l'atteinte : de 0 (pas d'atteinte) à 3 (atteinte sévère). Après avoir attribué un score à chaque organe, il est retenu un diagnostic de :

* Forme mineure (GVHc 1) : atteinte de 1 ou 2 organes de score 1 maximum

* Forme modérée (GVHc 2) :

- atteinte d'un organe (score 2),
- ou au moins 3 organes (de score 1 maximum)
- ou atteinte des poumons (score 1)

* Forme sévère (GVHc3) :

- atteinte d'au moins un organe (score 3)
- ou atteinte du poumon (score 2)

Un traitement est recommandé dès la forme modérée.

F. Thérapeutique

1/ Préventive

- Immunosuppression post-greffe : l'association de ciclosporine A et de méthotrexate, ou de ciclosporine A et de mycophénolate mofétil (selon les indications) est couramment utilisée. La ciclosporine A est parfois remplacée par le tacrolimus. Par ailleurs le sérum anti-lymphocytaire utilisé au moment du conditionnement pour limiter les risques de rejet, effectue une déplétion T (détaillée dans la partie 3).

- Manipulation du greffon avant la greffe : la déplétion en lymphocytes T se fait par sélection positive des cellules souches CD34. Cette technique a pour inconvénients : une augmentation du rejet ou de non-prise du greffon, une aggravation du déficit immunitaire post-greffe, l'abolition de l'effet GVL et donc un risque de rechute plus élevé.

2/ Curative

- GVH aiguë : le traitement curatif est indiqué pour les GVH de grade supérieur à I. La corticothérapie est initialement employée. En cas d'échec, il faut recourir à une association à d'autres immunosuppresseurs voire des anticorps monoclonaux (anti-récepteur de l'IL2, anti-TNF α).

- GVH chronique : si son meilleur traitement préventif reste la prévention de la GVH aiguë, son traitement curatif repose sur la ciclosporine A et la corticothérapie. D'autres immunosuppresseurs comme le thalidomide, le mycophénolate mofétil sont utilisés. La photothérapie extracorporelle a montré de bons résultats surtout sur l'atteinte cutanée isolée.

PARTIE 2 : LA RECONSTITUTION HEMATOLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE APRES GREFFE

I. BASES FONDAMENTALES

A. Impact de la reconstitution immunitaire sur la rechute, GVL, GVH

Après allogreffe de CSH, tous les patients développent une immunodéficience profonde consécutive:

- au conditionnement pré-greffe,
- à la lyse des cellules T résiduelles du receveur par les T allogéniques du donneur,
- aux traitements immunosuppresseurs pour prévenir ou traiter la GVH.

Ces facteurs cumulés bloquent la reconstitution immunitaire et ainsi augmentent l'incidence des infections et de la rechute de la maladie initiale. Malgré la bonne prise de greffe dans le tissu hématopoïétique du receveur, l'immunité n'est fonctionnelle qu'après plusieurs mois voire plusieurs années après la greffe.

B. Principaux acteurs du système immunitaire reconstitué

Tout le système immunitaire du donneur va remplacer celui du receveur. Ce système immunitaire est composé :

- d'une immunité innée (qui comprend les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules NK)
- et une immunité adaptative (qui comprend essentiellement les lymphocytes T et B).

Grâce à la production de médiateurs solubles et de facteurs de croissance dans le microenvironnement médullaire, les CSH transplantées vont se différencier en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes. Ces précurseurs vont rapidement se différencier en effecteurs cellulaires.

1/ L'immunité innée

L'immunité innée est la première à se reconstituer chez le receveur. Très schématiquement, elle agit de façon non spécifique comme une première ligne de défense de l'organisme :

- Les PNN attirés au niveau du site infectieux, par des facteurs chimiotactiques, phagocytent le pathogène.

- Les macrophages se lient via les opsonines aux germes encapsulés et les phagocytent au niveau splénique (*Streptococcus pneumoniae* et les *Klebsiella*). Le déficit de ce type de défense correspond aux états d'asplénie après irradiation corporelle totale.

- La reconnaissance de motifs conservés au sein des pathogènes, les PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) par des récepteurs (des cellules dendritiques entre autres), principalement les TLR (*Toll like receptor*) et les NOD (*cytosol nucleotide-binding oligomerization domain*), initie deux voies principales de transduction du signal. Une qui régule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et TNF α et l'autre les interférons de type 1 (alpha et bêta). Ainsi, la reconstitution en 2 à 4 semaines de cette immunité innée va constituer la clé de voute pour engendrer la GVH aiguë dès la sortie d'aplasie du receveur mais aussi être la première ligne à fournir une réponse anti-infectieuse. Par exemple, parmi les cellules dendritiques, nous distinguons les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et plasmacytoïdes (pDC). Alors que les pDC sont importantes dans l'immunité anti-virale et anti-tumorale par la production d'interféron de type 1, les mDC localisées dans les tissus, capturent, appréhendent et présentent les antigènes et instruisent le système immunitaire adaptatif. Par exemple, le LPS reconnu par les TLR4 à la surface des DC et des macrophages entraîne la sécrétion d'IL-12. L'IL-12 à son tour stimule la production d'IFN γ par les cellules NK. L'IFN γ active la réponse anti-microbienne (synthèse d'oxyde nitrique et superoxyde), augmente la fonction phagocytaire des macrophages, et induit la synthèse de chémokines pro-inflammatoire orientant le système adaptatif vers une réponse TH1 (figure 6). Cette réponse est à la fois la base d'une réponse anti-microbienne et à l'initiation de la GVH. Nous comprenons que toute manipulation visant à diminuer la GVH affaiblira le système immunitaire et augmentera le risque d'infections opportunistes.

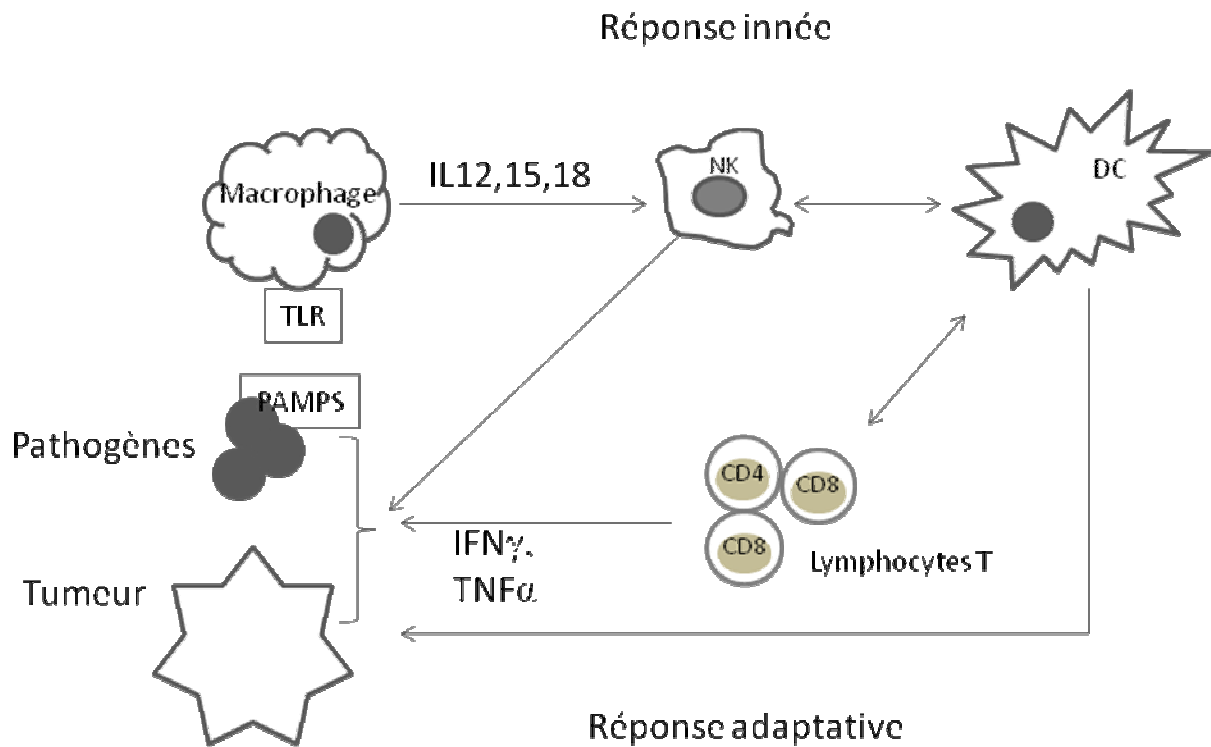


Figure 6 : Connexions entre réponse innée et adaptative nécessaire à la réponse anti-infectieuse et la réponse anti-tumorale.

2/ La réponse immune adaptative

La réponse immune adaptative est composée de deux principaux effecteurs : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

L'immunité humorale est sous le contrôle des immunoglobulines (Ig) et des lymphocytes B. Les LB activés vont devenir des plasmocytes capables de synthétiser des immunoglobulines soit grâce à la coopération LB et LT4 (voie T-dépendante) soit indépendamment des LT4. Selon le pathogène, un clone plasmocytaire s'expandra le mieux, sécrétant un type particulier d'immunoglobulines. Les anticorps des trois classes d'immunoglobulines favorisent la phagocytose de l'agent pathogène. Dans le type de déficit de l'immunité humorale, le risque infectieux est constitué par les infections bactériennes et virales.

L'activation des LT nécessite la présentation de l'antigène sur le CMH dans un contexte de co-stimulation présent sur la CPA. Il s'en suit une expansion clonale cellulaire et une mémoire vis-à-vis de l'antigène rencontré. La réponse lymphocytaire T est utile contre un antigène pathogène mais aussi un antigène tumoral. Elle est délétère lorsque le TCR reconnaît un allo-antigène ou un allo-HLA et entraîne la prolifération oligoclonale d'un clone T allo-réactif :

c'est la GVH. L'éducation des thymocytes nouveaux du donneur dans le thymus du receveur, est capitale pour l'induction de tolérance et pour la réponse anti- infectieuse [39].

II. CHRONOLOGIE [40]

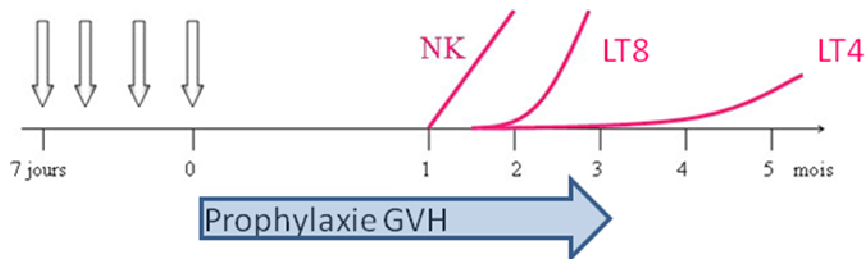
La reconstitution immunitaire n'est pas corrélée à la reconstitution d'un taux cellulaire, et ce d'autant plus pour le système immunitaire adaptatif. Malgré un taux normal de LT circulants, ceux-ci conservent longtemps une mauvaise prolifération aux antigènes spécifiques ou aux mitogènes. Ils peuvent aussi avoir un défaut de cytotoxicité et sécréter un profil cytokinique différent. De même, la production d'immunoglobulines et d'anticorps à certaines vaccinations n'est pas rétablie concomitamment au taux de LB circulants.

A. De J0 à 4 semaines : l'immunité innée

1/ Les cellules granuleuses

Après la greffe de CSH, une période limitée dans le temps de neutropénie favorise le développement d'infections opportunistes bactériennes et fongiques (Candida, Aspergillus). La sortie d'aplasie caractérisée par la reconstitution d'un taux de PNN $>1.10^9/L$ prévient ces infections. La normalisation des granulocytes (PNN puis monocytes puis macrophages) a lieu entre 2 et 4 semaines. Cette reconstitution est soumise aux facteurs liés à la greffe tels que la source du greffon et le conditionnement. Ainsi, la durée de la neutropénie est plus courte lors d'une greffe de CSP comparée à une greffe de moelle osseuse [41]. Un taux normal de PNN ne signe pas une fonctionnalité normale. On observe des défauts de chimiotactisme, de production d'anions superoxydes et de bactéricidie au moins dans les 2 mois suivant la greffe (ce d'autant que le patient est traité pour GVH par corticoïdes).

Conditionnement



Reconstitution
PNN : 14-30 jours
NK : 2 mois
LT8 : 3 mois
LT4 : 4 à 12 mois
IgM et IgG : 3 mois
IgA : > 1 an

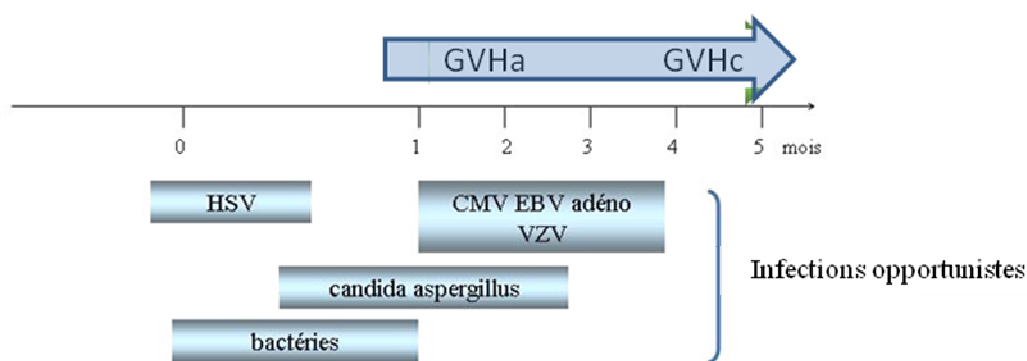


Figure 7 : Chronologie de la reconstitution immunitaire post-greffe et ses complications infectieuses[42]. Apparaissent après la greffe (J0) : les granuleux (PNN), puis les lymphocytes NK, puis les LT (CD8 puis CD4) et enfin la coopération T-B permet au LB de sécréter des immunoglobulines (IgM puis IgG puis IgA). Les infections virales sont très probables depuis la greffe (surtout une récurrence de l'HSV) et pendant toute la période d'immunosuppression lymphocytaire T profonde décrite jusqu'à 5 mois environ, en l'absence de GVH.

La période d'agranulocytose post-greffe favorise les infections bactériennes

Si cette période se prolonge, et s'il y a adjonction de la corticothérapie pour une GVHa, les infections mycotiques peuvent survenir.

2/ Les cellules NK

Les NK recouvrent un taux normal dans les 1 à 2 mois post-greffe, de façon indépendante de : la source du greffon, du conditionnement, de l'âge du patient et de la survenue de GVH [43]. Les premiers NK sont CD56^{fort} et CD16^{diminué}, c'est-à-dire d'un phénotype compatible avec une forte production cytokinique et une faible cytotoxicité. Puis, les CD56^{diminué} apparaissent avec une plus faible sécrétion cytokinique mais une puissante cytotoxicité [44]. La reconstitution du répertoire des récepteurs inhibiteurs et activateurs est graduelle. Elle débute 6 mois à 1 an après l'allogreffe de CSH, contrastant ainsi avec la rapide cinétique de reconstitution de la population NK globale [45]. Les cellules NK contribuent à la défense précoce contre les infections virales (leur reconstitution est accélérée en cas d'infection à CMV).

3/ Les cellules dendritiques

La reconstitution des cellules dendritiques est rapide et dépendante de la source du greffon. Globalement, le taux de mDC revient à la normale avant les pDC. Il a été montré que les DC nouvellement produites dérivent du donneur. Cette reconstitution est soumise aux facteurs liés à la greffe : elle est d'autant plus rapide que le donneur est apparenté, avec un conditionnement non myéloablatif, et que le greffon ne subit pas de sélection CD34+[46].

B. Après 1 mois: l'immunité adaptative

1/ L'immunité humorale

a. Taux de LB circulants

Les LB circulants sont à des taux très faibles dans le sang circulant pendant 2 à 3 mois après la greffe. Le lymphocyte B nécessite ce temps minimum, en l'absence de GVH, pour suivre toutes les étapes de son ontogénie dans la moelle osseuse du receveur, depuis la CSH transfusée. Les lymphocytes B rencontrés après l'allogreffe de CSH présentent un phénotype naïf les premiers mois : expression du précurseur antigénique précoce CD10, puis des marqueurs CD1c, CD5, CD23 et CD38, et des immunoglobulines membranaires IgM et IgD. Ensuite, en l'absence de GVH, le phénotype B mature (CD19+ CD20+) apparaît 3 à 6 mois après l'allogreffe de CSH.

b. La fonctionnalité du LB

La fonctionnalité du LB est mesurée par la production d'immunoglobulines (Ig) dans le sérum. Cette fonctionnalité s'acquiert tard dans l'année après la greffe: normalisation des IgM en premier (2-6 mois), suivie de celle des IgG (3-18 mois), puis de celle des IgA (6-36 mois). Les taux d'Ig sont supranormaux 1 à 2 ans après greffe. L'analyse des répertoires des chaînes lourdes des BCR révèle une oligoclonalité au cours des premiers mois, avec retour à la norme dans les 4 à 6 mois. Cependant, la reconstitution des clones lymphocytaires B reste précoce et contraste avec celle, plus tardive, des lymphocytes T.

c. Impact des lymphocytes B

Réponse anti-infectieuse : Une déficience de l'immunité protectrice humorale envers les pathogènes viraux et bactériens est observée après greffe. En effet, la diminution des Ig circulantes, les changements de classe d'Ig altérés et la perte de la complexité des

réarrangements des gènes des Ig [47] conduit à un défaut global de production d'immunoglobulines.

Aussi le défaut de production des sous-types d'IgG (IgG2 et IgG4) peut diminuer la réponse T indépendante à certains antigènes polysaccharidiques exprimés par des pathogènes comme le *Streptococcus pneumoniae*. Les anticorps produits par une réponse T-dépendante sont produits à un taux normal à partir d'un an après la greffe. Ainsi, le risque bactérien perdure longtemps, du fait d'une réponse anticorps protecteur sub-optimale conditionnée d'une part par le faible taux de LB, mais aussi par un défaut de coopération B-T (LT4). Les stratégies de supplémentation du receveur par des immunoglobulines polyvalentes intra-veineuses ont montré un intérêt vis-à-vis de l'incidence des infections dans les greffes de CSH issues de donneur non apparenté [48].

L'érythroblastopénie :

Lors d'une greffe présentant une incompatibilité sanguine ABO, la persistance d'anticorps anti-A (plus rarement, anti-B) peut inhiber pendant plusieurs mois l'implantation des progéniteurs érythroïdes du donneur chez le receveur et provoquer une érythroblastopénie. Lors de greffes non myéloablatives, la persistance plus longue de lymphocytes B du receveur semble augmenter le risque d'érythroblastopénie persistante [49-50].

Les GvH aiguë et chronique sont toutes deux associées à une reconstitution B retardée. Les lymphocytes B du donneur reconnaissent des antigènes mineurs d'histocompatibilité spécifiques du receveur, deviennent des plasmocytes avec sécrétion d'anticorps dirigés contre ces antigènes. Ainsi, le Rituximab (un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, donc anti lymphocytes B) est efficace chez certains patients atteints de GVH chronique réfractaire [51]. Par ailleurs, la présence d'anticorps anti-antigènes mineurs (mHA codés par le chromosome Y) chez le receveur homme greffé par un donneur féminin a été associée à la survenue d'une GVH chronique et à la maintenance de la rémission.

2/ L'immunité cellulaire

a. Les LT conventionnels

La reconstitution immunitaire lymphocytaire T est globalement plus rapide que celle des LB car elle n'attend pas les étapes de l'ontogénie du LT. Notons qu'il existe des LT conventionnels avec un TCR $\alpha\beta$ et des LT avec un TCR $\gamma\delta$. Ces derniers ont un TCR spécialisé dans la reconnaissance des protéines de choc thermique (cellules cancéreuses), et des ligands non peptidiques (phosphorylés ou lipidiques de mycobactérie par exemple). Il semble que ces LT ne soient pas restreints au CMH, il faut les considérer comme de l'immunité innée, impliquée dans la défense anti-infectieuse et anti-tumorale.

Taux de LT circulants. La reconstitution du pool lymphocytaire T s'organise selon trois sources :

- les lymphocytes T résiduels du receveur,
- les lymphocytes T matures du greffon,
- les lymphocytes T naïfs issus de la différenciation intrathymique des cellules souches et progéniteurs du donneur chez le receveur.

Schématiquement, la voie thymo-indépendante constitue la source majeure de lymphocytes T les 3 à 6 premiers mois. En effet, la majorité des lymphocytes T sont originaires de l'expansion périphérique des lymphocytes T matures du greffon. Leur phénotype est généralement de type mémoire, bien que les lymphocytes T4 naïfs puissent également subir une certaine expansion périphérique tout en maintenant leur phénotype naïf [52]. La voie thymo-indépendante est plus efficace dans la population LT8 que LT4. Il apparaît alors une grande proportion d'une population T avec des marqueurs d'activation notamment CD28⁺ et HLA-DR⁺ au sein des LT. Dans un second temps, la prise de greffe des progéniteurs hématopoïétiques et le ré-enclenchement de la fonction thymique permettent la libération de lymphocytes T matures naïfs. La thymopoïèse ne devient significative qu'après 6 mois suivant la greffe chez les jeunes adultes, et semble quasi-inexistante après 60 ans [53]. De fait, la reconstitution des LT se fait essentiellement sur les LT8 mémoires avec comme conséquences :

- l'inversion du ratio CD4/CD8,
- la diminution du pool de cellules naïves
- la perte de la diversité du répertoire T.

Fonctionnalité. La fonction T est diminuée pendant 6 à 12 mois, avec un degré variable selon la source du greffon et la GVH. Leur dysfonction est due aux effets délétères de la GVH qui :

- augmente l'apoptose des LT par l'AICD,
- ralentit l'éducation thymique par des dommages de l'épithélium thymique
- modifie le troisième signal nécessaire à l'activation optimale des LT par modification de l'environnement cytokinique.

L'impact. La qualité de la reconstitution thymo-dépendante présente un impact clinique important. La faible thymopoïèse post-greffe est associée à une augmentation du risque d'infections opportunistes et de GVH [54]. Une immunodéficience peut persister malgré un taux de lymphocytes T normal mais avec un répertoire du TCR restreint.

b. Les LT Régulateurs

Les cellules T régulatrices (T_{reg}) contrôlent les réactions immunitaires et induisent la tolérance périphérique. Les T_{reg} (CD4⁺ CD25^{fort}) sont principalement générées dans le thymus, (mais aussi dans les organes lymphoïdes périphériques) où elles rencontrent les antigènes du soi. Elles pourraient, dans le cadre particulier des allogreffes de CSH, par contact direct, supprimer les réponses LT4 et LT8 spécifiques d'auto- ou d'allo-antigènes [55]. Leurs capacités fonctionnelles ne semblent pas altérées après la greffe, même en cas de GVH [56].

c. Les iNKT

Le nombre de NKT invariants semble diminué chez les patients atteints de GVH aiguë et chronique extensive. Chez la souris, ils diminuent la survenue de GVH aiguë sans affecter l'effet GVL. Chez les patients soumis à un conditionnement de type TLI (*Total Lymphoid Irradiation*) + SAL, une très bonne reconstitution iNKT post-greffe s'est associée à une forte diminution de la GVH aiguë sévère (de grades II-IV). Or, ce conditionnement, préserve les iNKT du receveur et augmente donc leur fréquence par rapport aux autres lymphocytes [57].

C. Reconstitution immunitaire à long terme

Des études à long terme (plus de 20 ans après l'allogreffe de CSH) ont mis en évidence une immunité normale chez les patients greffés : les taux des cellules mononucléées circulantes étaient comparables à ceux de leurs donneurs respectifs. Cependant, une persistance de

lymphocytes T (notamment LT4) avec un répertoire du TCR restreint chez des patients adultes plus de 5 ans après allogreffe peut se voir [58].

III. FACTEURS INFLUANCANT LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

A. L'âge du receveur

Chez les enfants, le thymus est généralement plus fonctionnel que chez l'adulte et permet une cinétique plus rapide de reconstitution d'un répertoire lymphocytaire T diversifié et fonctionnel. Ainsi la cinétique de reconstitution de LT naïfs est plus rapide et plus élevée dans la population pédiatrique. Cette reconstitution plus rapide est corrélée à une meilleure protection contre les infections.

B. La source du greffon

La reconstitution immunitaire après greffe de CSP est généralement caractérisée par une récupération plus rapide du taux normal de cellules myéloïdes puis lymphoïdes comparée aux greffes de moelle. Mais, le G-CSF augmente le nombre de monocytes à activité immunosuppressive via la sécrétion d'IL10 et des DC qui orientent les LT vers une réponse TH2 dans le greffon. Ainsi, il altère la réponse immunitaire du receveur contre les infections bactériennes et virales.

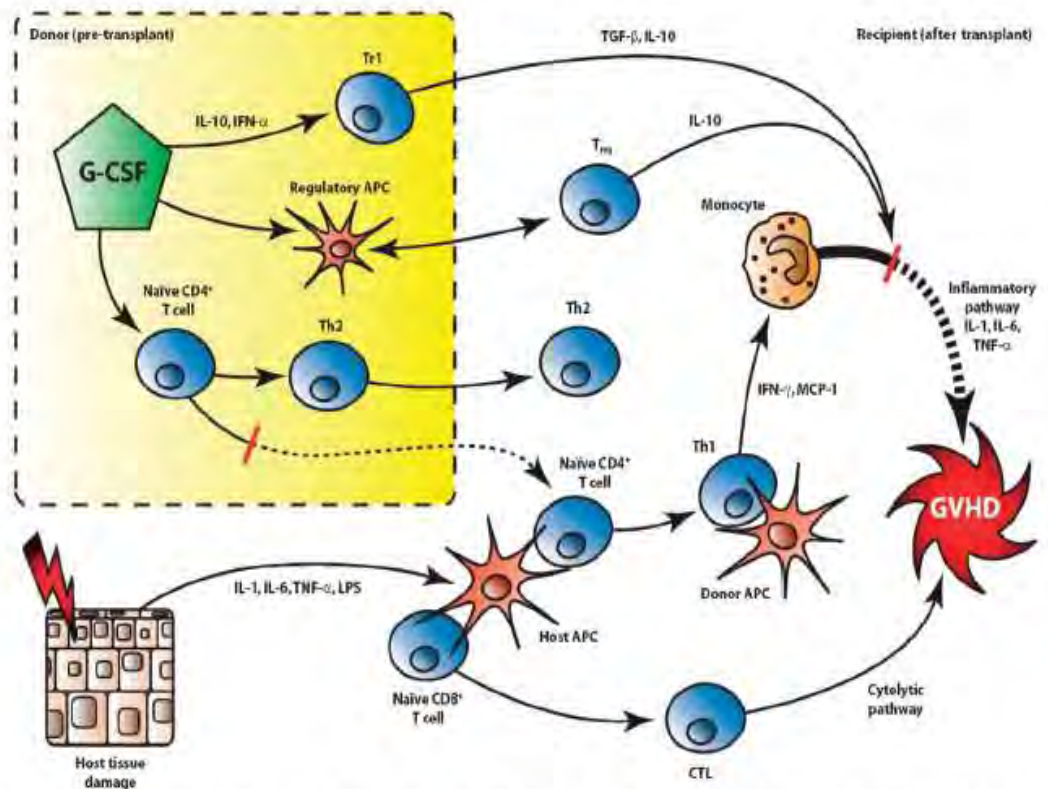


Figure 8 : Immunorégulation de la reconstitution immunitaire par le G-CSF [59]

Le G-CSF a des effets immunomodulateurs sur la GVH et la réponse anti-infectieuse par 3 principaux mécanismes :

- Surexpression de GATA3 des LT avec orientation TH2
- Génération de LT Tr1 produisant de l'IL10
- Induction de CPA régulatrices qui induisent des LT régulateurs

Par contre les receveurs de sang de cordon placentaire ont un taux d'infections dans les 50 jours post-greffe plus élevé et principalement des infections bactériennes attribuées à un retard d'apparition des PNN et lymphocytes fonctionnels dans le sang périphérique.

C. La manipulation du greffon

1/ La déplétion T du greffon

Pour diminuer l'incidence de la GVH, la déplétion lymphocytaire *ex vivo* se solde par un risque accru d'infections et de rechute de la maladie initiale [60]. Les lymphocytes T matures du greffon constituent la principale source de lymphocytes T les premiers mois après l'allogreffe. Une déplétion lymphocytaire T compromet la reconstitution immunitaire précoce.

2/ Le Campath® (alemtuzumab)

L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal humanisé contre l'antigène CD52 exprimé sur les cellules lymphoïdes et sur les cellules de la lignée monocyttaire. Il est utilisé dans le cadre de déplétions lymphocytaires T *in vivo*, manipulations associées à des taux très faibles de GVH aiguë et chronique [61]. Cependant, il présente des effets indésirables :

- un retard de la reconstitution immunitaire (lymphocytes T)
- une augmentation de l'incidence des infections virales [62]
- une augmentation de la fréquence des rechutes [47]

3/ La sélection CD34+

Cette méthode de sélection positive des progéniteurs CD34+ respecte la reconstitution T mais avec une réponse proliférative retardée, une augmentation du pourcentage de cellules LT4 mémoires et un répertoire du TCR restreint. La reconstitution B semble par contre plus rapide, et NK intacte. Au total les patients recevant un greffon sélectionnés en CD34 ont une période d'immunosuppression plus longue.

D. Le conditionnement

Après un conditionnement, il ne persiste que très peu de lymphocytes T du receveur. Les conditionnements NMA permettent la persistance d'un nombre significatif de lymphocytes T résiduels du receveur [63]. La persistance de lymphocytes du receveur après conditionnement NMA est associée à une augmentation du risque de rejet de la greffe, une diminution du risque de GVH et une protection contre les infections virales (particulièrement le CMV) les premiers mois suivant la greffe. Ce conditionnement réduit la toxicité muqueuse, la myélosuppression et accélère la RI fonctionnelle même si la morbidité infectieuse reste élevée (taux d'infections bactériennes après 3 mois plus élevé, attribué à la fludarabine).

E. Degré de compatibilité du greffon et maladie du greffon contre l'hôte

1/ Familial vs non familial

Le choix d'un donneur non familial augmente les disparités (HLA et mHA), donc les alloréactions (GVH, rejet), et entrave la reconstitution T.

2/ Polymorphisme génétique des HLA et mHA

La reconstitution thymo-indépendante est influencée par les rencontres antigéniques et peut induire des expansions clonales massives.

IV. CONSEQUENCES CLINIQUES DE LA RI

A. Les complications infectieuses

Si la GVH cause 15% de mortalité post-greffe en condition HLA géno-identique, les infections sont la cause de 17% de mortalité et 21% en condition de greffe non apparentée. Les complications post-greffe précoces ne sont plus la cause de cette mortalité du fait des nouvelles mesures de prophylaxie infectieuse et le recours au G-CSF. Par contre les agents viraux, fongiques sont une menace infectieuse majeure entre J50 et J180 [64].

1/ Durant la période de neutropénie ($PNN < 0,5.10^9/L$) : infections bactériennes et fongiques

L'altération de la barrière digestive secondaire au conditionnement par chimiothérapie et/ou radiothérapie et l'utilisation de cathéters centraux sont des facteurs de risque infectieux. Parmi les infections bactériennes documentées, environ 70 % sont dues à des cocci à Gram positif (principalement staphylocoque à coagulase négative en rapport avec l'utilisation de cathéters veineux centraux et streptocoques du fait de conditionnements de greffe lourds responsables d'une toxicité muqueuse importante) [65]. Un tiers des infections bactériennes est due à des bacilles à Gram négatif : entérobactéries ou bacilles pyocyaniques (par translocation digestive). La symptomatologie d'une infection est souvent pauvre, du fait de l'absence de signe inflammatoire, et la fièvre est souvent le seul signe d'infection. Le pourcentage de fièvres cliniquement ou microbiologiquement documentées varie selon les études entre 20 et 65%. Les points d'appel clinique les plus fréquents sont : les foyers pulmonaires, les infections sur site de cathéter et les infections à point de départ buccal ou pharyngé. Les mesures préventives ont

largement diminué l'incidence de ces infections (décontamination digestive par des antibiotiques et antifongiques non absorbables ...).

2/ Les infections virales

Le risque d'infection virale est principalement dû à des herpes virus et plus occasionnellement l'adénovirus, le rotavirus et les entérovirus.

a. Le virus Epstein Barr (EBV)

L'EBV est un virus ubiquitaire (90% de la population mondiale séropositive) persistant après la primo-infection dans les LB sous une forme latente. L'infection latente est sous le contrôle des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'EBV. La réponse humorale ne joue qu'un rôle mineur dans le contrôle de la phase latente de l'EBV. En allogreffe de CSH les receveurs immunodéprimés présentent un risque de développer des proliférations incontrôlées de lymphocytes B du donneur infectés et transformés par l'EBV. Les facteurs de risque principaux de ces syndromes lymphoprolifératifs B (PTLD, *post-transplantation lymphoproliferative disorder*) sont [66] :

- Le degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur,
- L'utilisation d'une déplétion en lymphocyte T du greffon à titre de prophylaxie de la GVH,
- Le traitement de la survenue d'une GVH aiguë de grade IV par administration du sérum anti-lymphocytaire,
- La pathologie initiale d'indication de la greffe médullaire,
- Une deuxième greffe après échec de la première transplantation.

Plus de 50 % des lymphoproliférations EBV-induites apparaissent précocement entre le deuxième et le quatrième mois post-greffe. Ce pourcentage décroît progressivement passé 4 mois, et l'incidence du PTLD est quasi-nulle au delà du huitième mois. Cette incidence corrèle avec le taux de LT, la réponse aux mitogènes et la réponse aux antigènes de l'EBV qui sont atteints respectivement en moyenne à six, sept et neuf mois après greffe [67].

b. Adénovirus

L'adénovirus est un virus ubiquitaire à l'origine d'infections souvent bénignes, parfois épidémiques dans les communautés. Après la contamination par voie aérienne ou digestive, le virus se multiplie localement dans les cellules de l'épithélium et l'infection se propage de proche en proche, les destructions cellulaires entraînant une inflammation locale. Chez

l'immunocompétent, une réaction immunitaire par production d'anticorps spécifiques précède la guérison. Chez l'immunodéprimé, l'infection peut se disséminer et entraîner une maladie qui engage fortement le pronostic vital. Trois stades d'infection peuvent être définis :

- le portage asymptomatique qui correspond à la détection du virus dans un prélèvement sans symptômes cliniques,
- l'infection probable, définie par la mise en évidence du virus dans deux prélèvements (d'un même site ou de sites différents) associée à des symptômes cliniques,
- la maladie, définie par la détection du virus dans un site normalement stérile (sang, biopsie) associée à des symptômes cliniques.

L'association entre l'infection sévère à adénovirus et l'immunodéficience de type cellulaire suggère que l'adénovirus est normalement contrôlé par la réponse immunitaire cellulaire. Les infections à adénovirus se développent après greffe, plus tôt chez les enfants (< 30 jours) que chez les adultes (> 90 jours). En dehors des mesures d'isolement et d'hygiène habituelles, il n'existe aucune prophylaxie spécifique de ces infections. Le traitement antiviral des infections à adénovirus est encore décevant : plusieurs molécules ont été proposées (ribavirine, ganciclovir, vidarabine) mais elles n'ont pas fait la preuve de leur efficacité dans des études à grande échelle. Le cidofovir, actif *in vitro* sur les adénovirus, pourrait présenter un intérêt surtout s'il est administré précocement. Le transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques anti-adénovirus constitue une nouvelle voie thérapeutique en cours d'évaluation.

c. Cytomegalovirus [68]

Bien que les sujets sains CMV séropositifs ne présentent aucune évidence d'infection active, la fréquence des précurseurs cytotoxiques CMV-spécifiques reste très élevée dans le sang périphérique. Cette fréquence persistant tout au long de la vie, suggère que la réponse T et plus particulièrement CD8 joue un rôle actif dans la protection de l'hôte vis-à-vis d'une réactivation virale. Le défaut de protection rencontré à l'égard du CMV peut être expliqué dans les 2 premiers mois post-greffe par une déficience quantitative des CD8+ spécifiques. Entre 3 et 6 mois, le nombre de cellules T spécifiques du virus revient à la norme, excepté pour les patients qui développent l'infection ou n'hébergent pas le virus (receveurs séronégatifs pour le CMV).

La GVH aiguë et le déficit de fonctions LT4 (auxiliaires) influencent la cinétique de la reconstitution d'une immunité cellulaire spécifique du CMV. Il existe ainsi, une corrélation entre la présence ou l'absence d'une prolifération T CMV spécifique (mesurée par test de transformation lymphoblastique) et le développement d'une activité T cytotoxique protectrice contre l'infection à CMV.

3/ Infections micro-organismes tels que *Toxoplasma gondii* ou *Pneumocystis jiroveci*

Elles surviennent en général plus tardivement que les infections virales et sont d'autant plus fréquentes que le déficit de l'immunité spécifique est profond. Les infections mycotiques surviennent dans 11% des cas, dont plus de 80% d'entre elles sont des infections à *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. [69]. Les facteurs prédisposant sont : la longueur de la neutropénie, une mucite, la GVH et les traitements pour la GVH (notamment les corticoïdes), la lymphopénie T4, la présence de cathéters centraux.

B. GVH/GVL

Une thymopoïèse altérée (répertoire TCR altéré) est corrélée à la survenue de la GVH, d'infections opportunistes et de manifestations auto-immunes qui pourraient être associées à des sélections intrathymiques déficientes [70].

1/ La thymopoïèse

La puissance tolérogène du thymus s'illustre par le fait que, parmi 100 précurseurs T ayant migré dans le thymus, seulement 2 à 5 cellules T matures naïves, à la fois compétentes et tolérantes, seront exportées en périphérie. L'éducation des lymphocytes T dans le thymus comprend plusieurs étapes :

- La sélection positive de clones T restreints au CMH du soi générés au cours de la recombinaison aléatoire des segments de gènes codant pour les parties variables du TCR
- la délétion des clones T autoréactifs (sélection négative)

Le résultat de ces processus de sélection est que le répertoire des lymphocytes T à la sortie du thymus est restreint au HLA du soi et tolérant à la plupart des antigènes autologues. Les lymphocytes T issus de la différenciation des cellules souches chez l'hôte assurent la reconstitution immunologique à long terme, sans GVH puisqu'issus de la maturation intrathymique. Trois facteurs principaux vont altérer les cellules épithéliales thymiques (TEC) :

- Les régimes de conditionnement pré-greffe : des études murines ont montré [71] une diminution dose-dépendante des TEC, une chute des taux intrathymiques de transcrits d'IL7. L'IL7 est responsable de la prolifération, survie et différenciation des thymocytes immatures puis la maturation T et l'exportation des lymphocytes T [72]. Certaines études suggèrent que l'administration de KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) avant ou pendant le régime de

conditionnement permettrait de protéger les TEC et améliorerait la reconstitution immunitaire après greffe [73].

- La survenue d'une GVH endommage l'architecture thymique par des infiltrats lymphocytaires T alloréactifs dans le thymus et par une production intra-thymique de facteurs pro-inflammatoires. La GVH détruit ainsi la distinction entre zones corticale et médullaire et augmente l'expression sur les TEC de molécules de co-stimulation favorisant la destruction des thymocytes éduqués [74].

- Le Sérum anti-lymphocytaire a une cytotoxicité propre vis-à-vis des thymocytes et serait partiellement responsable des dommages du microenvironnement thymique.

2/ L'HPE : l'expansion périphérique homéostatique

Après allogreffe de CSH, une lymphopénie T s'installe du fait :

- du régime de conditionnement qui détruit les lymphocytes T de l'hôte et réduit la thymopoïèse

- d'une augmentation de l'apoptose périphérique des lymphocytes T matures par la GVH et les immunosuppresseurs.

La toxicité de la greffe (conditionnement, GVH, immunosuppresseurs), associée à une fonction thymique décroissante avec l'âge, favorise l'expansion homéostatique des cellules T matures périphériques (HPE) du greffon [75]. Plusieurs mécanismes homéostatiques expliquent l'HPE :

- le recrutement de lymphocytes T avec un seuil d'activation du TCR abaissé : nombreuses molécules de co-stimulation [76].
- les cytokines massivement sécrétées après le conditionnement constituent aussi les signaux de survie majeurs des lymphocytes T.

L'HPE ne restaure pas complètement les taux de lymphocytes T. En effet, la polyclonalité périphérique dépend des spécificités de TCR disponibles et des combinaisons peptide-HLA à la source des expansions. L'efficacité de l'HPE des LT8 (surtout de phénotype mémoire) est plus importante que celle des LT4. Ces produits d'expansions périphériques sont susceptibles de provoquer une GVH [77-78].

V. TECHNIQUES D'ÉVALUATION DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

A. Phénotypage lymphocytaire

1/ Phénotype non spécifique

La cytométrie en flux est l'outil le plus fréquemment employé dans l'évaluation de la reconstitution immunitaire après greffe.

- Lymphocytes T totaux CD3+
- Lymphocytes T auxiliaires CD3+ CD4+
- Lymphocytes T cytotoxiques CD3+ CD8+
- Lymphocytes T cytotoxiques naïfs CD3+ CD8+ CD45RA+
- Lymphocytes T cytotoxiques mémoires CD3+ CD8+ CD45RO+
- Lymphocytes T auxiliaires naïfs CD3+ CD4+ CD45RA+
- Lymphocytes T auxiliaires mémoires CD3+ CD4+ CD45RO+
- Lymphocytes NK CD3- CD56+
- Lymphocytes NKT CD3+ CD56+. Le sous-type NKT invariant est détecté à l'aide du tétramère du CD1d, qui n'est pas fait en routine.
- Lymphocytes B CD19+ (ou CD20+, ou Ig de surface)

La ségrégation entre lymphocytes naïfs et mémoires basée exclusivement sur l'expression de l'isoforme du CD45 est peu fiable, étant donné que la population CD8+CD45RA+ contient des cellules partageant certaines caractéristiques phénotypiques avec les cellules activées au cours du premier contact antigénique. Cependant nous considérerons dans notre étude cette définition comme suffisante, par manque d'autres marqueurs de surface réalisés en routine.

2/ Analyses de tétramères MHC : spécificité antigénique particulière

Les tétramères permettent d'identifier les lymphocytes T dont le TCR reconnaît un complexe antigène-HLA particulier (figure 9).

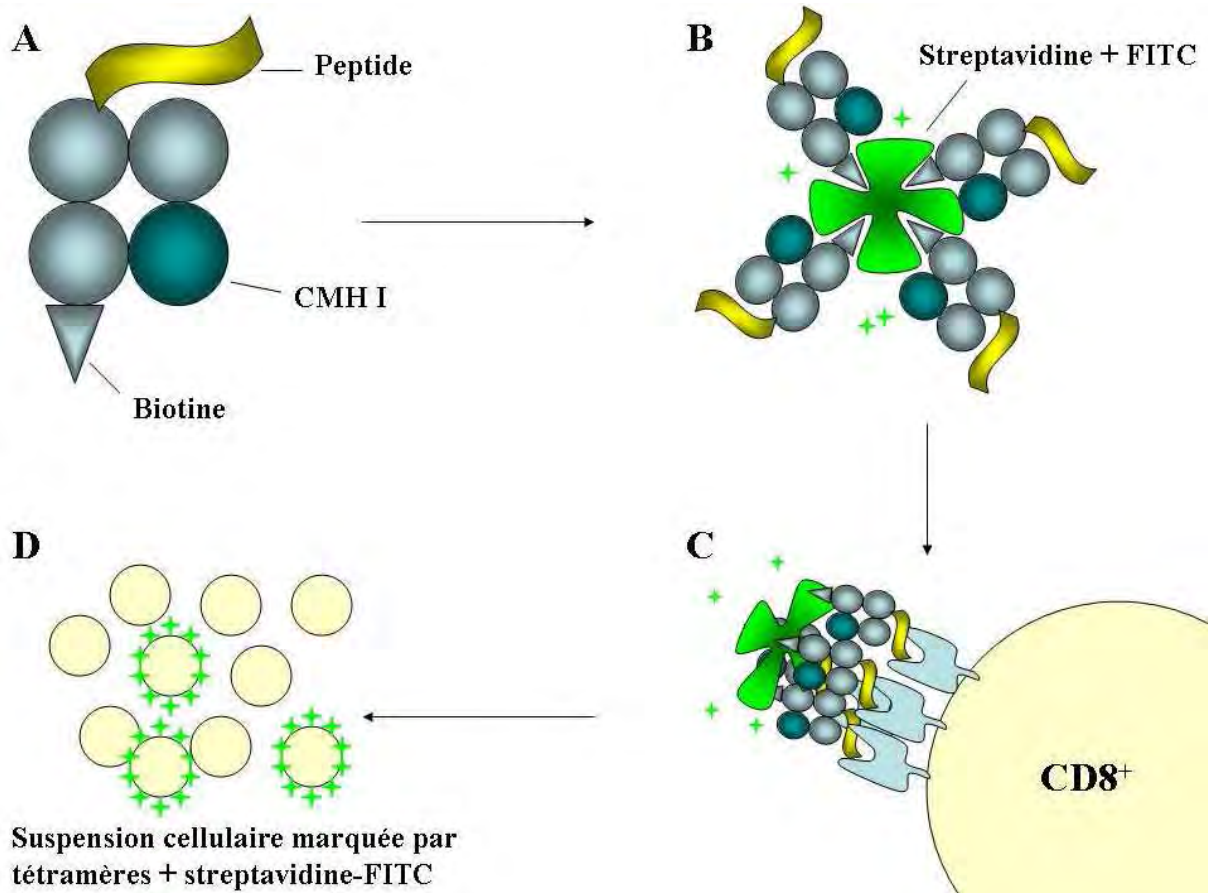


Figure 9 : Principe de la technique de cytométrie par tétramères (d'après Immunobiology 7^{ème} édition, Garland Science 2008).

Des molécules HLA sont associées à un peptide d'une part, à la biotine d'autre part. Ce complexe interagit avec la streptavidine, elle-même complexée à un fluorochrome (FITC). La stoechiométrie est de 4 molécules de biotine pour 1 de streptavidine, assurant de la sorte une avidité suffisante du complexe vis-à-vis des TCR. En raison de sa nature, cette application est limitée aux peptides présentés sur un HLA dont l'allèle est le plus fréquent dans la population.

B. Quantification des cercles d'excision des TCR (TREC)

Les TCR (*T-cell Receptor*) sont des protéines dimères qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et qui sont codées par quatre gènes différents (a, b, d et g). 95% des LT périphériques expriment un TCR de type $\alpha\beta$, tandis que 5% environ expriment un TCR de type $\gamma\delta$. La partie variable amino-terminale des TCR, responsable de la reconnaissance de l'antigène, est codée par une combinaison des segments géniques « variable (V) », « diversité (D) » et « jonction (J) » pour les chaînes β et δ , et par une combinaison des segments V et J pour les chaînes α et γ . Un quatrième segment « constant (C) » encode les domaines constants du TCR. Le réarrangement des segments géniques à l'origine de la diversité du répertoire des cellules T, se produit essentiellement dans le thymus. Il est catalysé par l'action de deux enzymes, RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activating Gene 1 et 2*).

Lors des réarrangements, RAG1-RAG2 induisent la formation d'« épingles à cheveux » aux extrémités codantes de l'ADN et différentes enzymes provoquent le clivage de ces « épingles à cheveux » et la soudure des extrémités codantes. Après ligation des extrémités codantes, l'ADN recombiné sera transcrit et traduit. Par ailleurs, un fragment d'ADN se retrouve excisé de l'ADN génomique donc en dehors de l'appareil chromosomique. Ses extrémités se lient: épisomique, circularisé, il devient un TREC, cercle d'excision du TCR. Présents dans les thymocytes et les lymphocytes T matures, les TREC ne semblent pas présenter de rôle spécifique.

Ces TREC sont présents dans les lymphocytes T matures qui quittent le thymus et ne sont pas dupliqués lors des divisions cellulaires subséquentes : ils sont le biomarqueur de référence de la thymopoïèse. En cas d'expansion périphérique exacerbée des lymphocytes T matures, les taux de TREC peuvent être artificiellement diminués malgré une activité thymique normale. La vitesse de reconstitution immunitaire après greffe dépendrait de l'activité thymique pré-greffe chez le receveur [79]. De plus, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre le taux de LT4 naïfs et le taux de TREC après la greffe [75]. D'ailleurs, les principaux facteurs associés à une fonction thymique déficiente (taux de TREC faibles) sont similaires à ceux associés à des taux plus faibles de LT4 naïfs. Parmi ceux-ci :

- un âge avancé du receveur,
- la survenue d'une GVH chronique
- une déplétion en lymphocytes T du greffon.

C. Diversité du répertoire TCR

L'analyse de la diversité clonale des lymphocytes T périphériques permet [80]:

- de déterminer la compétence du système immunitaire après greffe, puisqu'une large diversité est synonyme de réponses efficaces à des stimuli variés ;
- de détecter une réponse immunitaire en cours, reflétée par une dominance mono ou oligoclonale.

Une analyse du répertoire TCR peut être réalisée par cytométrie en flux ou détection moléculaire. La partie variable de la chaîne α du TCR possède trois domaines hypervariables ou *Complementarity Determining Regions* (CDR), tandis que la chaîne β en compte quatre. Les CDR3 des chaînes α et β jouent un rôle clef dans la définition de la reconnaissance antigénique et sont générés par d'intenses réarrangements des segments V, D et J puis par insertion/délétion au hasard de nucléotides de jonction. Au final, des produits de tailles hétérogènes assurent à chaque lymphocyte T un TCR unique. Le *spectratyping* (immunoscope) évalue la

diversité du répertoire T à tout moment par l'examen du polymorphisme de longueur du CDR3 dans une population lymphocytaire. Une analyse similaire évalue la diversité des CDR3 des chaînes lourdes des immunoglobulines des lymphocytes B [81].

Les individus sains présentent un répertoire TCR hautement diversifié avec une distribution gaussienne d'approximativement 8 fragments au sein de chaque famille de CDR3. Après greffe allogénique, une contraction du pool de lymphocytes T et une réduction de la diversité des TCR sont clairement associés à une immunodéficience clinique [82]. La reconstitution du système immunitaire est caractérisée par l'émergence de populations de cellules T mono- ou oligoclonales reflétant des réponses immunitaires spécifiques envers un antigène en particulier : antigènes allogéniques (GVH et GVL), antigènes viraux tels que CMV ou EBV. La diversité clonale des lymphocytes B périphériques est aussi réduite après greffe allogénique, mais la reconstitution rapide de l'immunoscope contraste avec celle des cellules T. Cette différence pourrait refléter la synthèse continue de lymphocytes B rencontrée tout au long de la vie, par comparaison avec le déclin de la fonction thymique chez l'adulte.

D. Evaluation de la capacité fonctionnelle

L'analyse des fonctions lymphocytaires permet d'apprécier si des populations cellulaires normales en nombre et en phénotype présentent bien une fonction immunitaire intacte.

1/Test de sécrétion de cytokines : ELISA/ELISpot

Ces tests permettent la quantification des cytokines constitutives ou induites *in vitro*, de populations sécrétrices (figure 10). Les techniques les plus utilisées sont le marquage intracytoplasmique et l'ELISpot (*single-cell Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*).

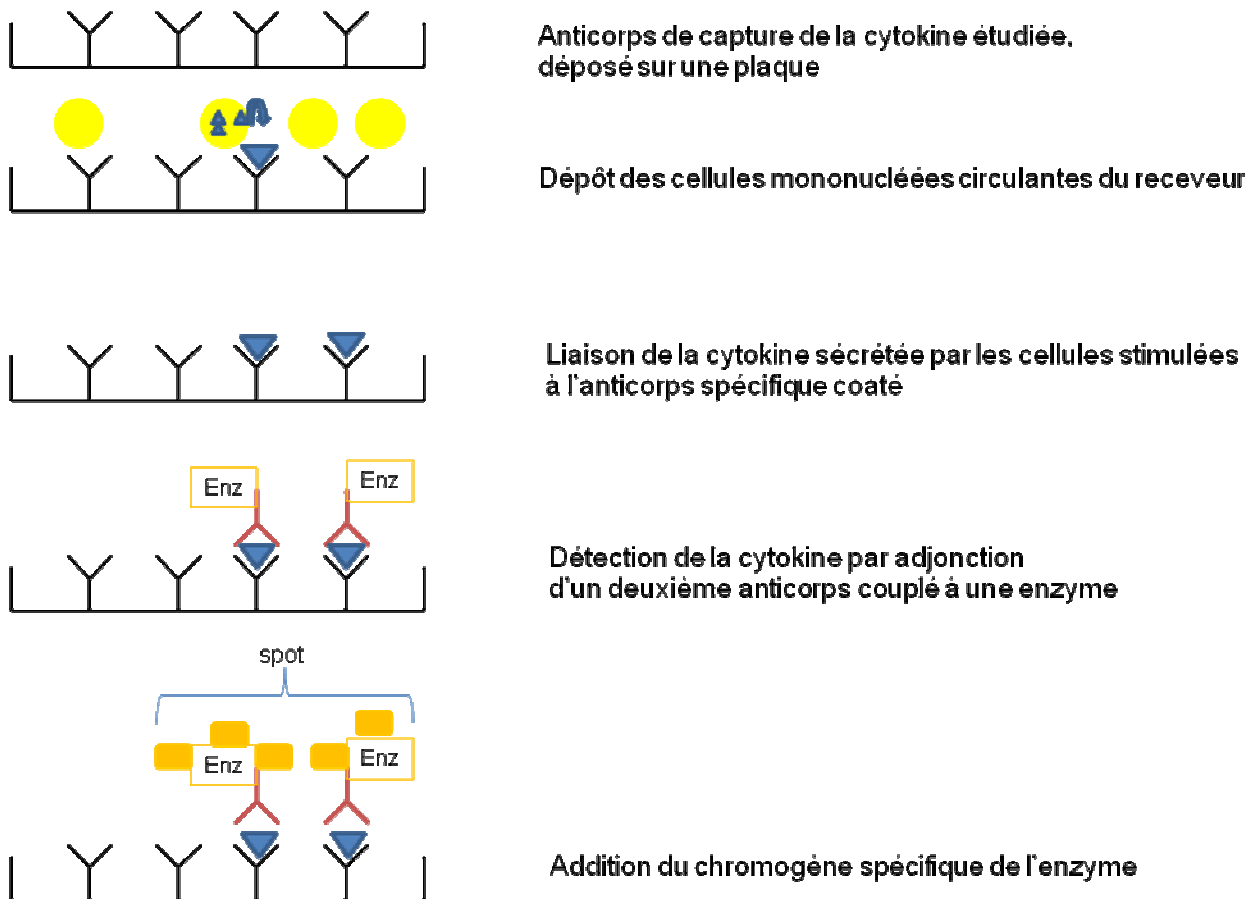


Figure 10 : Principe de réalisation d'un ELISPOT.

Lors d'un ELISpot, les cellules T fraîchement isolées sont cultivées sur un tapis d'anticorps spécifiques de la cytokine d'intérêt. Les cellules T individuelles sécrètent des cytokines qui se lient aux anticorps et forment des « spot », qui seront visualisés par adjonction d'un second anticorps couplé à la peroxydase. Le nombre de spots révèle le nombre de cellules T sécrétrices.

2/ Tests lymphoprolifératifs

Les tests lymphoprolifératifs sont basés sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les noyaux de cellules en mitose. Les cellules stimulées par des mitogènes ou des antigènes vont proliférer de façon plus ou moins importante en fonction de leur fonctionnalité.

3/ Cytotoxicité

La fonction cytotoxique peut être évaluée grâce à une mesure de la lyse de cellules cibles marquées au ^{51}Cr . Après 4 heures de co-culture (cellules cytotoxiques et cellules cibles), le ^{51}Cr libéré dans le milieu à la suite de la destruction des cibles permet de calculer l'indice cytotoxique.

PARTIE 3 : LE SERUM ANTI-LYMPHOCYTAIRE DANS L'ALLOGREFFE DE CSH

La plupart des allogreffes de CSH à l'heure actuelle sont réalisées avec un donneur non apparenté. Ces greffes sont associées à un risque plus élevé de complications immuologiques. La principale complication est la GVH. Or, la mortalité liée à la greffe (TRM) pour ces patients atteints de GVH aiguë grade I, II, III, IV est respectivement : 27, 43, 68, 92% [83]. Pour la GVH chronique, la TRM est de 28% si elle est limitée et de 48% si elle est extensive [84]. De nombreuses stratégies pour prévenir la survenue de la GVH sévère ont été développées. Le sérum anti-lymphocytaire (SAL) est une préparation d'immunoglobulines polyclonales de type IgG et IgM, produites chez le lapin ou le cheval, contre des LT humains [85]. Il est utilisé depuis une trentaine d'années en greffe de CSH, avec un mode d'administration dans le conditionnement qui permet de réaliser une allogreffe de CSH en condition non apparentée avec une TRM proche de la greffe en condition apparentée HLA-identique [86].

I. LES SERUMS ANTI-LYMPHOCYTAIRES en ALLOGREFFE DE CSH

A. Les produits commercialisés

- ATGAM (Pharmacia, Piscataway, NJ) produit par l'immunisation de chevaux contre les thymocytes humains.
- Thymoglobuline (Genzyme, Cambridge, MA) produit par l'immunisation de lapins contre des thymocytes humains.
- SAL-Fresenius (SAL-F, Fresenius, Allemagne) produit par l'immunisation de lapin contre les cellules de lignées jurkat.

Ce dernier a été privilégié pour le conditionnement des patients traités au CHU de Nancy.

B. Le SAL Fresenius

Le SAL-Fresenius est extrait de sérum de lapins préalablement immunisés par des lymphoblastes T humains. Il est composé d'immunoglobulines hautement purifiées avec une activité spécifique contre les lymphocytes T humains.

1/ Mécanismes d'action

a. Les essais *in vitro*

Le sérum anti-lymphocytaire contient des anticorps dirigés contre les antigènes exprimés sur les LT humains. Le SAL le plus étudié est le SAL de type thymoglobulines. On peut citer tout de même pour le SAL Fresenius des anticorps dirigés contre les antigènes : CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD25, CD44, CD45, HLA-DR, HLA I chaîne lourde, β 2 microglobuline. Ainsi, il entraîne une déplétion T par effet cytotoxique [87]. Il entraîne aussi un blocage des molécules impliquées dans l'activation du LT (CD28...), affecte leur capacité de homing (liaison aux intégrines...) et leur activité cytotoxique [88]. L'activité cytotoxique du SAL dépend de sa concentration sérique:

- $>100\mu\text{g/mL}$: opsonisation des LT et phagocytose par les macrophages, lyse dépendante du complément (LT4 et LT8)
- à des taux plus faible il induit l'ADCC (Antibody dependent cytotoxicity cell)
- à la concentration $<1\mu\text{g/mL}$ le SAL-Fresenius n'est plus fonctionnel.

Son activité n'est pas restreinte aux LT, puisque des données *in vitro* ont montré que les cellules dendritiques de patients traités par SAL, incubées avec le complément de celui-ci, sont 5 fois moins vivantes que les patients non traités [89]. Le SAL Fresenius pourrait aussi induire un signal d'apoptose vis-à-vis de cellules de lignées leucémiques myéloïdes et lymphoïdes (effet anti-tumoral), et vis-à-vis des LB et monocytes (cellules support de la GVH chronique) [90-91]. Les cellules NK et les cellules souches hématopoïétiques seraient résistantes à ce signal d'apoptose, voire les CSH entreraient plus rapidement en prolifération sous l'effet du SAL [92]. Ces données malheureusement qu'*in vitro*, manque d'études complémentaires.

b. Modes d'action *in vivo*

Les effets cytotoxiques du SAL *in vitro* sont observés à une concentration de $100\mu\text{g/mL}$. Cette concentration est atteinte *in vivo* quand des doses de SAL Fresenius sont utilisés à au moins 20mg/kg [93]. La concentration efficace du SAL dans le sérum des patients est difficile à déterminer, mais il a été montré qu'elle est dose-dépendante. Plus la dose administrée est élevée, plus la concentration efficace sérique est élevée, plus l'effet du SAL est fort [94]. L'effet immunosuppresseur du SAL persiste au-delà de sa durée d'application effective. Ainsi, lorsque la concentration sérique atteint $100\mu\text{g/mL}$, quelques heures après l'administration, les LT du receveur sont déplétés. Du fait d'un taux résiduel persistant plusieurs semaines, le SAL

induit une déplétion T *in vivo* des LT repeuplant du donneur (moindre incidence de la GVH, mais diminution aussi de l'effet GVL). *In vivo*, les mDC et pDC circulantes, 2 cellules pivot dans l'initiation de la GVH, sont aussi moins nombreuses. Les mécanismes probables sont la reconnaissance d'antigènes tels que CD1a, CMHI et II, CD11a et CD86 exprimés à la surface des DC. Cette liaison induit la lyse médiée par le complément de la DC [95]. Certaines études suggèrent, par contre, qu'à des concentrations sériques supérieures (250µg/mL, soit une administration de plus de 30mg/kg de SAL-Fresenius), le SAL aurait aussi une cytotoxicité vis-à-vis des lymphocytes B, les plasmocytes et donc une activité anti-myélomateuse [96-97].

c. Spécificité d'action

Le SAL-Fresenius est très largement dépourvu d'anticorps réagissant de manière croisée contre les érythrocytes, les protéines plasmatiques humaines ou les membranes basales glomérulaires.

2/ Pharmacologie

a. Pharmacocinétique

Le SAL-Fresenius étant administré par voie intraveineuse, sa biodisponibilité est de 100%. En tant qu'anticorps antihumain, il est une protéine dont la dégradation est semblable aux protéines propres. On ne connaît aucun métabolite non-physiologique. La demi-vie du SAL-Fresenius est d'environ 14 jours chez un allogreffé de CSH. Les études de clairance indiquent que le SAL peut rester dans le sang jusqu'à 2 mois post-greffe [98]. Il y a deux phases de clairance : une précoce et rapide, l'« alpha-clairance » pendant les 4 premières semaines post-greffe et une lente, la « bêta-clairance » pendant les 4 semaines suivantes [99]. Le processus de clairance dépend d'une combinaison de facteurs incluant les protéines de dégradation et l'absorption à la surface des cellules lymphocytaires. La variabilité selon les patients inclut le diagnostic, l'âge, le poids, catabolisme protéique, le statut de la maladie au moment de la greffe, le turn-over cellulaire et donc l'absorption d'anticorps.

b. Pharmacodynamie

L'effet anti-lymphocytaire du SAL est moins le fait de sa persistance dans le sang (pharmacocinétique) que son effet *de novo* thymique (pharmacodynamie).

3/ Indications reconnues en allogreffe de CSH

Le SAL-Fresenius est utilisé en combinaison avec d'autres immunosuppresseurs pour la prophylaxie et le traitement de la GVH et du rejet en allogreffe de CSH.

4/ Effets secondaires

Les effets secondaires les plus fréquemment observés sont : les nausées, les ascensions thermiques et les vertiges. Les états fébriles à plus de 40 °C ainsi que les frissons sont rares et, dans la plupart des cas, s'estompent au cours des premiers jours de traitement. Pendant ou peu après la perfusion, une réaction anaphylactique peut survenir. Le risque est présent surtout dans les trois premiers jours de traitement.

Comme avec les autres protéines hétérologues, une maladie sérique peut survenir après 8-14 jours de traitement.

II. IMPACT SUR LA GVH ET GVL

La première utilisation de sérum anti-lymphocytaire lors du conditionnement d'allogreffe de CSH a été réalisée en prophylaxie du rejet d'une seconde greffe chez des patients atteints d'aplasie médullaire [100]. De nombreuses études ont analysé par la suite l'impact sur la survie globale (OS), la survie sans rechute (DFS), et la mortalité liée à la toxicité de la greffe (TRM). La même équipe a mis en évidence par la suite que l'utilisation du SAL dans le conditionnement prévenait la survenue de la GVH [101]. De là, nombreuses études se sont concentrées sur l'impact du SAL sur les conflits immunologiques (GVH et GVL). Par contre, peu d'études ont détaillé l'impact du SAL sur la reconstitution immunitaire après la greffe.

A. Impact sur la GVH aiguë et chronique

1/ Les essais randomisés

Il y a quatre principaux essais randomisés testant l'hypothèse que le SAL prévient la survenue de la GVH.

Le premier a évalué l'intérêt d'un traitement précoce de la GVHa plutôt qu'une prophylaxie [102]. Cette étude s'est confirmée plus tard avec le traitement de la GVHa corticorésistante par

le SAL-Fresenius et les thymoglobulines [103]. Aucune de ces études n'a montré un intérêt curatif du SAL et tous les patients ainsi traités sont décédés d'infections.

Le second, publié par l'équipe de Ramsay en 1982 [104], a étudié l'effet bénéfique du SAL utilisé en prophylaxie de la GVH. Il montre que les greffes apparentées HLA-identiques avec du SAL dans le conditionnement ont une moindre incidence de la GVHa sévère (21% contre 48%) par rapport aux patients ne recevant pas de SAL. Mais l'intérêt du SAL dans les greffes géno-identiques n'a pas été confirmé par d'autres équipes, surtout avec l'évolution des conditionnements [105].

Le troisième rapport et le quatrième rapport à citer, ont évalué l'intérêt du SAL dans le conditionnement d'allogreffe de CSH issues de donneurs non apparentés -indication classiquement retenue à l'heure actuelle. L'équipe de Bacigalupo [106] a étudié des patients randomisés pour recevoir ou pas du SAL de type thymoglobulines dans le conditionnement. Les patients sans SAL ont une incidence de GVHa sévère quatre fois supérieure et l'incidence d'une GVHc extensive deux fois plus importante que le groupe ayant reçu 15mg/kg de Thymoglobulines. Les études GITMO [106-107] ont ensuite discuté l'intérêt de la dose élevée de 15mg/kg *versus* une dose plus faible de 7,5mg/kg avec un suivi médian allant de 2 à 4 ans. La prophylaxie de la GVHc par 7,5mg/kg de thymoglobulines a été définie comme facteur prédictif d'une meilleure qualité de vie, avec moins d'atteinte pulmonaire, un arrêt des immunosuppresseurs plus rapide et une TRM à 4 ans moins élevée [108]. L'équipe de Finke, à l'issus d'une étude multicentrique sur 201 patients, a étudié l'intérêt de l'administration de 60mg/kg de SAL-Fresenius lors du conditionnement. L'incidence de la GVHa sévère était diminuée de moitié par l'administration de SAL et l'incidence de la GVHc diminuée à 12,2% (*versus* 42,6% quand le conditionnement ne comprend pas de SAL). Cependant, la survie globale, la survie sans rechute et la mortalité par infections étaient comparables dans les deux groupes [109].

2/ Les études comparatives non randomisées

Nombreuses études rétrospectives convergent aussi vers la conclusion que l'utilisation du SAL lors du conditionnement de la greffe diminue l'incidence et la sévérité de la GVH.

Nous exposons dans un premier temps, les études sur l'impact de l'administration de SAL dans le conditionnement de patients appariés pour les facteurs de risque de survenue de la GVH (annexe 3). La principale de ces études, a été réalisée entre les centres de Seattle et Huddinge [110]. Les patients ont été appariés selon leurs caractéristiques cliniques et leurs facteurs de

risques prédictifs de la survie après la greffe. Les patients recevant du SAL (Huddinge) versus ceux qui n'en reçoivent pas (Seattle) ont une incidence bien moindre de la GVHa (grade II : 12% vs 55% et de grade III-IV 0% vs 30%). Le groupe de Hambourg [111] a confirmé ces résultats dans une étude monocentrique comparant des patients greffés pour LAM en condition apparentée.

Ensuite il nous faut citer les études qui ont comparé deux groupes de patients avec des greffes de risques différents en termes de complications immunologiques (annexe 3). Ces études ont évalué l'impact bénéfique de l'administration du SAL sur la diminution de l'incidence de ces complications. Les études canadienne d'Alberta [112] et ultérieurement de Seattle [113], ont comparé des patients recevant une greffe non apparentée (donc à plus fort risque de GVH) avec du SAL (Thymoglobulines 4,5mg/kg) dans le conditionnement, aux greffes apparentées, sans SAL dans le conditionnement. L'incidence de la GVHa sévère est réduite dans le groupe traité par du SAL et l'incidence de la GVHc est aussi réduite ou similaire dans les deux groupes.

L'étude de Finke [114] a comparé des patients allogreffés avec des CSH issues de donneur non apparenté HLA identique (sans SAL dans le conditionnement) *versus* des patients allogreffés avec un donneur HLA différent (avec SAL dans le conditionnement, Fresenius à 60-90mg/kg). Cette étude, ainsi que des études plus récentes où le typage HLA se réalise grâce à la biologie moléculaire [115-116] montrent que l'incidence de la GVHa et GVHc, ainsi que l'OS, la DFS et la TRM sont identiques dans ces deux types de greffe grâce à l'adjonction de SAL. Par contre, certains auteurs mentionnent une tendance plus élevée à la rechute (sensible aux DLI), et une augmentation de l'incidence des infections, non mortelles, comme l'EBV.

Enfin, nous citons les études qui ont mis en évidence l'impact de la dose administrée de SAL (annexe 4). L'équipe de Meijer a comparé 3 doses de Thymoglobulines administrées dans le conditionnement [117]. L'incidence de la GVHa pour 4, 6 ou 8mg/kg de thymoglobulines administrées est respectivement de 44%, 4% et 0%. L'incidence de la GVHc est respectivement de 44%, 11% et 8%. Au total, entre 6 et 8mg/kg, la prévention de la GVH est la meilleure ; l'OS et la TRM sont comparables. Pour le SAL Fresenius, l'étude de la dose optimale à administrer est controversée. Par exemple l'équipe d'Ayuk [118] compare deux doses de SAL-fresenius (30 vs 60mg/kg/j) lors du conditionnement pour allogreffé de CSH issues de donneurs non apparentées. Ces patients greffés pour hémopathies malignes n'ont aucun impact significatif sur l'incidence de la GVHc, mais la TRM à 2 ans est meilleure pour la dose de 30mg/kg du fait d'une moindre incidence infectieuse.

B. Impact sur la GVL

Des études *in vitro* montrent un effet du SAL sur des lignées leucémiques (cellules Jurkat, Daudi, lymphoblastique DG75, myéloblastique U937, érythroleucémie K562...). *In vivo*, deux études principales sont à citer. La première [96] a montré que le SAL Fresenius ajouté au conditionnement d'allogreffe pour myélome permet, comme attendu, de diminuer l'incidence de la GVHa (de 22% à 11%) et de la GVHc (de 65% vs 23%). Le SAL permet aussi d'augmenter l'EFS à 3 ans de 27% à 39%. Ces observations s'accompagnent d'une réponse globale et d'un taux de rémission complète à J100 meilleure pour le groupe traité avec le SAL, ce d'autant que la dose est supérieure à 30mg/kg. L'activité anti-myélomateuse du SAL est supposée sur la base d'immunoglobulines dirigées contre certains antigènes candidats : anti CD20, CD40, CD52, CD138, CD74 et IL6R. Le SAL serait ainsi capable de déclencher une cytotoxicité (contre les plasmocytes) dépendante du complément [91]. La deuxième étude [119] a comparé la greffe de moelle osseuse non apparentée chez 97 patients atteints de LMC en phase chronique. 31 patients recevaient une dose inférieure à 60mg/kg de SAL-fresenius, et 66 patients une dose supérieure à 60mg/kg. La dose de 60mg/kg suffisait à diminuer l'incidence du rejet et de la GVHa. Par contre, une dose supérieure à 60mg/kg permettait de diminuer la rechute avec une DFS améliorée de 68% vs 39% et une OS augmentée de 72% vs 52%.

Au total, au travers de la littérature se dessine une problématique évidente de la dose optimale de SAL : la dose <40 mg/kg semblerait suffisante pour diminuer l'incidence de la GVHa sans augmenter la TRM par infections ; la dose > 60mg/kg augmenterait aussi l'incidence des infections graves par retard de la reconstitution immunitaire mais pourrait augmenter la DFS par une moindre incidence de rechutes.

III. IMPACT SUR LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

A. Impact de la dose

Quelques études ont essayé d'ajuster au mieux la dose minimale de SAL qui diminuerait l'incidence et la sévérité de la GVH sans engendrer de conséquence sur la reconstitution immunitaire. Ainsi, l'utilisation de SAL-Fresenius à une faible dose de 25mg/kg associée à un conditionnement hautement immunosuppresseur permet de diminuer l'incidence de la GVH aiguë sévère de plus de 90% dans les greffes haplo-identiques [120] ou avec des Thymoglobulines à une dose de 6 à 10mg/kg [91].

Trois principales études sont à citer dans l'étude de la RI selon la dose de SAL administrée.

La première, réalisée par l'équipe de Meijer [121] a étudié la RI de greffés de moelle osseuse non apparentée, après un conditionnement comprenant du SAL comparativement à la RI des

patients greffés avec une moelle osseuse apparentée sans SAL dans le conditionnement. Le groupe ayant reçu du SAL a une incidence plus faible de la GVHa et la GVHc mais un retard de la RI des LT (CD4 et CD8) dans les 6 mois post-greffe. Par contre le taux de LB et NK circulants n'est pas altéré par rapport aux allogreffes avec donneur apparenté. D'ailleurs l'étude similaire de Saito [122] montre que c'est surtout le nombre de LT4 (naïfs CD45RA et mémoires RO+) circulants qui est en moyenne plus faible dans le sang des receveurs conditionnés avec du SAL. Leur fonctionnalité mesurée par la réponse à la PHA est aussi plus tardive.

L'étude pédiatrique de Duval a comparé l'effet d'une forte dose de SAL par rapport à une faible dose. Chez 31 enfants allogreffés en condition non apparentée, les thymoglobulines sont administrées lors du conditionnement soit à faible dose (7,5 mg/kg) soit forte dose (15,5 mg/kg/j). Le SAL retarde d'autant plus la reconstitution immunitaire et accroît le risque infectieux que sa dose est élevée [123]. La reconstitution des LT totaux (notamment des LT4) et des LB, est plus lente dans le groupe ayant reçu la forte dose. La RI des cellules NK et des LT8 est similaire dans les deux groupes. Ainsi les LT4 atteignent le taux circulant considéré comme requis chez l'enfant pour limiter les infections opportunistes de 100/ μ l à 8 mois (vs 4 mois) et les LB ont un taux reconstitué à 16 mois (vs 8 mois). Le délai de la RI est donc doublé lorsque la forte dose de SAL est administrée, avec comme conséquence clinique le taux de mortalité due aux infections opportunistes plus élevé.

Enfin, l'étude de Fehse, a identifié un retard de la RI (SAL-Fresenius 60-90 mg/kg versus 0mg/kg) des LT4, incluant les cellules naïves CD4+ CD45RA+ et les mémoires CD4+ CD45R0+ pendant plus de 6 mois post-greffe [124]. Par contre la mortalité due aux infections opportunistes n'était pas plus élevée. De même, l'étude rétrospective de Nakai [125] d'allogreffe de CSP apparentée (HLA identique ou non) a montré que même si les antigénémies CMV sont plus élevées et plus rapides à apparaître dans le groupe traité avec du SAL, l'incidence de l'infection à CMV est identique dans les deux groupes. Ces résultats sont probablement dus à la bonne prise en charge préemptive par le ganciclovir.

B. Les différences selon le type de SAL

Un rapport de l'EBMT en 2004 suggérait qu'il y avait non seulement un effet dose mais aussi une différence entre le SAL-Fresenius et les autres SAL qui entraîneraient une déplétion T plus profonde. Parmi les receveurs de CSH, l'administration de SAL issus de cheval est associé à un retard de RI (taux circulant et fonctionnalité des LT). Le déficit en LT persiste plus de 6 mois

post-greffe alors que l'administration de SAL issus de lapin, à dose équivalente, atteint rapidement un taux sub-thérapeutique ($<1\mu\text{g/mL}$). Dès J30, le taux circulant de SAL est en dessous d'une activité ($t_{1/2}$ 14 j). Ainsi, le déficit en LT se corrige dès J60. Il n'y a par contre aucune corrélation avec la RI des NK et LB dans les 100 premiers jours post-greffe.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. TYPE D'ETUDE

Il s'agit d'une étude rétrospective à visée comparative de deux doses de SAL (forte dose >60mg/kg et faible dose <60mg/kg). L'objectif principal est de déterminer la conséquence clinico-biologique de la dose de SAL sur la reconstitution immunitaire. Nous avons étudié, par ailleurs, l'impact sur la survie globale et l'incidence des principaux conflits immunologiques que connaît le receveur.

II. POPULATION ETUDIEE

A. L'échantillonnage

La population source est constituée par l'ensemble des patients, adultes et enfants, allogreffés au CHU de Nancy dans le secteur de transplantation médullaire, enregistrés consécutivement dans la base informatique de données « SEQUELLES » de greffe du Professeur Bordigoni depuis 1981 (base de données constituée sous Excel). La base de données sources contient des informations complétées par un recueil spécifique effectué dans les dossiers médicaux de greffe et de consultations de chaque patient.

L'échantillon sur lequel ce travail a porté, correspond aux patients allogreffés entre juin 2000 et janvier 2010. La répartition des caractères pré-greffe des patients inclus dans cette étude est homogène dans les 2 bras (SAL forte dose et SAL faible dose, tableau I)

B. Prophylaxie et traitement de la GVH

La prophylaxie de la GVH comporte soit l'association de ciclosporine A et mycophénolate mofétil, soit l'association de ciclosporine A et méthotrexate (administration de 15 mg/m² à J1 et de 10mg/m² à J3, 6 et 11). La ciclosporine est débutée les 24 heures précédant la greffe, la posologie initiale est de 3 mg/kg/jour puis elle est adaptée secondairement en fonction des dosages plasmatiques résiduels (taux entre 200 et 300 ng/ml).

L'administration de sérum antilymphocytaire (SAL) joue un rôle dans la prophylaxie de la GVH, mais aussi un rôle important dans la prévention du rejet. Le sérum anti-lymphocytaire a été administré à la dose totale de 40mg/kg ou 90 mg/kg sur 3 jours (à J-5, J-3 et J-1).

C. Typage HLA

La compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est indispensable. Le groupage HLA doit être réalisé sur deux prélèvements sanguins différents en lymphotoxicité d'une part et en

biologie moléculaire d'autre part. la technique de lymphotoxicité détermine les antigènes HLA de classe I (A,B) et de classe II (DR, DQ). En biologie moléculaire, le typage HLA est étudié au niveau générique pour les antigènes HLA de classe I (A, B, Cw) et au niveau allélique pour les antigènes de classe II (4 digits, DRB1, DQB1, DPB1, DQA). Nous parlons de donneur compatible 10/10^{ème} quand le donneur et le receveur sont HLA A, B, C, DR et DQ identiques.

D. Prophylaxie infectieuse

Tous les patients sont maintenus dans un environnement protégé : par les mesures d'isolement, le traitement de l'air (flux laminaire), la décontamination des surfaces et la décontamination digestive anti-bactérienne et antifongique qui va de paire avec la stérilisation de la nourriture. Les infections opportunistes sont systématiquement prévenues par différentes mesures :

- ✓ **Une prévention spécifique des infections à *Pneumocystis jirovecii* et *Toxoplasma gondii*** est réalisée par cotrimoxazole (Bactrim®) per os ou intraveineux à la dose de 30 mg/kg /prise un jour sur deux.
- ✓ **Prévention des infections à CMV.** Les produits sanguins transfusés sont irradiés à 25 Gy. Les receveurs CMV- reçoivent des produits sanguins CMV-. A ces mesures s'associe un traitement préemptif avec la surveillance deux fois par semaine de la charge virale CMV par PCR et la mise en route d'un traitement par ganciclovir si l'ADNémie est positive à deux reprises.
- ✓ **Perfusion d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses** à la dose de 100 mg /kg /semaine jusqu'au J100, poursuivie au moins jusqu'au sixième mois avec espacement des perfusions en fonction du dosage résiduel IgG et de la synthèse IgM.
- ✓ **Les infections fongiques** sont prévenues par l'administration de fluconazole en intraveineux de J-10 à J30, puis un relais par itraconazole dès la reprise alimentaire possible.
- ✓ **Prévention des herpès virus par acyclovir, valacyclovir**
En cas de séropositivité prégreffe du receveur pour varicelle – zona ou herpès simplex, un traitement par acyclovir 3x5 mg/kg/j Zovirax® est instauré jusque j360.

Toute neutropénie fébrile est traitée par une bi-antibiothérapie intra-veineuse à large spectre.

III. ETUDE DE LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE

A. Etude par cytométrie en flux de la reconstitution immunitaire lymphocytaire

L'analyse du phénotype des différents sous-types lymphocytaire a été réalisée à différents temps après la greffe : à J60, J100, J180 et J360. Les patients sont prélevés par ponction veineuse ou via le cathéter central. Les leucocytes totaux et le pourcentage de lymphocytes sont déterminés par automate (hématimétrie).

L'immunophénotypage des populations lymphocytaires T

Les marquages sont effectués avec des anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome particulier. Les lymphocytes T sont définis comme cellules CD3+. Ces LT CD3+ sont marqués pour leur TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Parmi tous les LT nous distinguons deux sous-types :

-les LT auxiliaires, CD3+ CD4+.

Parmi eux, nous distinguons les CD3+CD4+ CD45RA+ dits naïfs et les CD3+CD4+CD45RO+ dits mémoires. Les LT CD3+ CD4+ sont marqués séparément pour CD28, CD38, HLADR. Les LT4 CD25+ peuvent contenir des LT activés et des LT régulateurs. En l'absence du niveau d'expression du CD25 et d'autres marquages spécifiques des Tregs (comme foxp3 par exemple), nous ne pouvons pas distinguer ces deux populations au sein des LT4 CD25+. Nous n'avons donc pas pris en compte cette population dans notre étude.

-les LT cytotoxiques, CD3+CD8+.

Parmi eux, nous distinguons les LT cytotoxiques CD3+CD8+ CD45RA+ naïfs, les CD3+ CD8+ CD45RO+ mémoires. Avec les mêmes fluorochromes, les LT CD3+ CD8+ sont marqués séparément pour CD28, CD38, HLA-DR.

L'immunophénotypage des populations lymphocytaires B : les LB sont CD19+, et les plus immatures définis comme CD19+ CD5+

L'immunophénotypage des autres populations lymphocytaires

Les lymphocytes NK sont définis CD3- CD16+ CD56+

Les lymphocytes NKT sont définis CD3+ CD16+ CD56+. Le phénotypage des NKT invariant n'a pas été réalisé.

B. Etude par de la fonctionnalité de la reconstitution immunitaire lymphocytaire

Tests de transformations lymphoblastiques (TTL)

L'analyse des TTL a été réalisée à différents temps post allogreffe : à J60, J100, J180 et J360 de la greffe. Les cellules mononucléées des patients sont mises en culture en plaques 96 puits à fond plat sous un volume de 100 μ l, à la concentration de 1.10⁶ cellules par mL de milieu

RPMI 10% SAB, en présence de mitogènes (PHA ou PMA ionomycine) pendant 96 heures ou d'antigènes spécifiques (aspergillus ou CMV) pendant 144 heures. La suspension cellulaire est répartie distribuée en triplicate. Les puits contenant les suspensions cellulaires en présence du milieu RPMI 10% SAB sont des témoins négatifs. Au cours des 18 dernières heures d'incubation la thymidine tritiée est incorporée. A l'issue de l'incubation, la culture cellulaire est précipitée sur un filtre. Ce filtre est passé sur un compteur β . Le nombre de cpm (coups par minute) comptés sur le filtre indique le taux d'incorporation de la thymidine qui est proportionnel à la prolifération cellulaire.

IV. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique se décompose en 3 étapes :

- L'analyse descriptive : les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne, l'écart-type et la médiane, les variables qualitatives par des pourcentages.
- L'analyse comparative : nous avons recherché les facteurs associés à la probabilité de survenue d'une complication immunologique de type GVHa, GVHc, rechute, infections virales, bactériennes, mycotiques et parasitaires. Les facteurs étudiés étaient : l'âge, le conditionnement, le niveau de risque, le diagnostic initial, la compatibilité HLA, la source du greffon, la dose de SAL, la survenue d'une GVH aiguë et chronique sévères. Nous avons utilisé des modèles de régressions logistiques bivariées puis multivariées dans lesquels les variables « candidates » significativement liées à la probabilité d'avoir la complication étudiée à l'issue de l'analyse bivariée ont été incluses.
- L'analyse de survie. Nous avons décrit puis recherché la présence de facteurs pronostiques de la survie globale, de la survie sans événement et la mortalité toxique des patients greffés. La date d'origine était la date de greffe. Le recul a été fixé à 1 et 2 ans de la greffe. La méthode graphique de Kaplan-Meier a été utilisée pour représenter la fonction de survie globale, de survie sans événement et de mortalité liée à la toxicité du traitement. Le test du Log Rank (analyse bivariée) et le modèle de régression de Cox (analyse multivariée) ont permis d'étudier l'effet des différents paramètres testés individuellement puis indépendamment les uns des autres sur la survie des patients.

Pour l'ensemble des analyses effectuées le risque alpha a été fixé à 5%. Les analyses ont été effectuées sous le logiciel SAS v9.2.

RESULTATS

I. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

A. En pré-greffe (Annexe 5)

1/ Âge à la greffe

On décompte 121 patients receveurs dont 51 enfants (42,2%) et 70 adultes (57,8%), soit une moyenne d'âge de 25,1 ans [6 mois-64 ans].

2/ Diagnostic

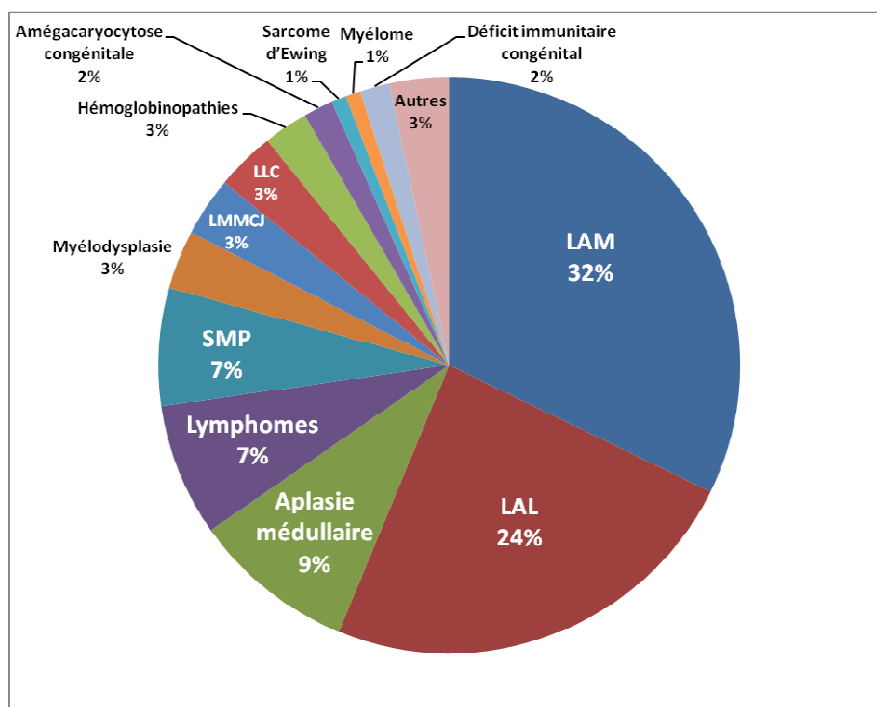


Figure 11 : Indications d'allogreffe de CSH.

1/Leucémies :

-aiguës (56%) : 32% leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), 24% leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

-chroniques(10%) : 7% leucémies myéloïdes chroniques et autres syndromes myéloprolifératifs (SMP) chromosome Philadelphie négatif (Phi-), 3% leucémies lymphoïdes chroniques (LLC).

2/Syndrome myélodysplasique (6%) dont 3% de leucémies myélonocytaires chroniques juvéniles (LMMCJ),

3/Tumeurs solides et hémopathies autres (13%) :

- les lymphomes hodgkiniens et non hodgkinien (LMNH) (7%)

- les myélomes multiples (1%)

-les sarcomes d'Ewing (1%), rhabdomyosarcomes (1%), épendymome (1%), gliome (1%), embryome (1%).

4/Hémopathies non malignes : aplasies médullaires idiopathiques (9%), maladie de Fanconi (2,5%), déficits immunitaires (2%) et d'autres maladies héréditaires (amégacaryocytoses 2%).

3/ Délai entre le diagnostic et la greffe

Le délai entre le diagnostic et la greffe est calculé pour l'ensemble des patients, y compris les pathologies non cancéreuses, ce qui explique sa longueur de 2 ans et 7 mois, soit 987 jours en moyenne mais de 481 jours en médiane (soit environ 1 an et 3 mois).

4/ Groupe à risque

Les greffes à haut risque sont déterminées par le diagnostic initial (maladies malignes) et le statut de la maladie avant la greffe (au-delà de la première rémission complète pour les hémopathies malignes aiguës, au-delà de la phase chronique pour les LMC ou en cas de rémission partielle pour les tumeurs solides). Elles se répartissent ainsi dans notre échantillon:

- Greffes à haut risque : 60,3%
- Greffes à bas risque : 39,7%

5/ Compatibilité HLA

La compatibilité donneur-receveur est pour 66% des patients 10/10^{ème}, pour 31,4% des patients 9/10^{ème} et pour 1,6% des patients 8/10^{ème}.

6/ Source de greffon

Deux sources principales sont à considérer dans notre étude :

- Moelle osseuse : 60,3 %
- Cellules souches périphériques : 39,7 %

7/ Compatibilité ABO

L'incompatibilité majeure est définie par la présence dans le plasma du receveur d'anticorps anti-A ou anti-B réactifs avec les globules rouges du donneur (par exemple, lorsque le donneur est du groupe A et le receveur du groupe O).

L'incompatibilité mineure est définie par la présence dans le plasma du donneur d'anticorps anti-A ou anti-B réactifs avec les globules rouges du receveur (par exemple, lorsque le donneur est du groupe O et le receveur du groupe A). La répartition est dans cette étude :

- Compatibilité : 40,5%
- Incompatibilité mineure : 24%
- Incompatibilité majeure : 34,7%
- Incompatibilité bidirectionnelle : 0,8%

8/ Statut CMV donneur/receveur

- Donneurs positifs : 75 (62 %)
- Receveurs positifs : 77 (63,6%)
- Couples donneur positif/ receveur négatif : 24 (19,8 %)
- Couples donneur négatif/ receveur positif : 26 (21,5 %)

9/ Sexe

- Donneurs hommes : 81 (67 %)
- Donneurs femmes : 40 (33 %)
- Couples donneur femme/ receveur homme : 24 (19,8 %)
- Couples donneur homme/ receveur femme : 25 (20,6%)

10/ Conditionnement

○ Le conditionnement myéloablatif a été administré à 52 patients (43 % des patients de l'étude), dont 27 patients (45,7 %) avec irradiation corporelle totale (12 Gray en 6 fractions sur 3 jours), 22 patients (37,3%) avec busulfan (dose \geq 16 mg/kg), et 3 patients avec un autre type de conditionnement.

L'irradiation corporelle totale ou le busulfan est associé pour 36 patients avec du cyclophosphamide, 4 patients ont reçu du VP16, 5 de l'aracytine, 2 du thiotepa et 2 du platine.

○ Le conditionnement non myéloablatif a concerné 69 patients (57 % des patients), dont 47 patients (68,1%) avec Fludarabine + Melphalan et 31,9% patients avec un conditionnement autre.

○ Le sérum anti-lymphocytaire (SAL) : 69 (57%) des patients ont reçu une faible dose (SAL Fresenius 40mg/kg) et 52 (43%) patients ont reçu une forte dose (SAL Fresenius 90 mg/kg). Les deux groupes ont une répartition des paramètres homogènes : paramètres influençant la survie, les conflits immunologiques et la reconstitution immunitaire (Tableau I).

Tableau I : Comparaison de la population étudiée dans le groupe ayant bénéficié de 40mg/kg de SAL versus le groupe ayant reçu 90mg/kg de SAL.

Paramètres	40mg/kg de SAL (n=69)	90mg/kg de SAL (n=52)	p=
Age	23,94 ans en moyenne [0-60,5] 21,65 ans de médiane	26,56 ans en moyenne [1-64] 24,34 ans de médiane	0,68
Source du greffon	Moelle osseuse : 42 (60,8%) CSP : 27 (39,2%)	Moelle osseuse : 30 (57,7%) CSP : 22 (42,3%)	0,72
Cellules injectées (moyenne/kg)	Cellules CD34+ : 4,94.10 ⁶ /kg LT : 14,6.10 ⁷ /kg	Cellules CD34+ : 4,60.10 ⁶ /kg LT : 10,77.10 ⁷ /kg	0,52 0,13
Niveau de risque	Haut risque : 40 (57,9%) Faible risque : 29 (42,1%)	Haut risque : 29 (55,7%) Faible risque : 19 (44,3%)	0,54
Compatibilité HLA	HLA-identique : 45 (65,2%) HLA-incompatible : 24 (34,8%)	HLA-identique : 35 (67%) HLA incompatible : 17 (33%)	0,81
Conditionnement	Myélo-ablatif : 31 (45%) Non myélo-ablatif : 38 (55%)	Myélo-ablatif : 30 (57,7%) Non myélo-ablatif : 29 (42,3%)	0,61
Prophylaxie de la GVH	Ciclosporine+Cellcept® : 32 (46,3%) Ciclosporine+méthotrexate : 32 Autres : 5 (7,2%)	Ciclosporine+Cellcept® : 27 (52%) Ciclosporine+méthotrexate : 25 (48%)	0,83

B. En post-greffe (annexe 6)

1/ Présence d'une maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

- GVH aiguë : 82 receveurs sont atteints de GVHa (soit 67% de notre échantillon). Parmi ces patients, selon la classification de Glucksberg (annexe 1), 11 patients sont atteints de GVH de grade I (soit 13,4% de notre échantillon), 59 patients atteints de GVHa de grade II (48%), 8 patients de GVHa de grade III (9,7 %) et 4 patients de GVHa de grade IV(4,8%).
- La GVH aiguë cutanée est survenue chez 50 patients (41,3%). La GVHa du tube digestif touche 54 patients (44,6%) et la GVHa hépatique 14 patients (11,5%).
- GVH chronique : a été classée selon Akpek pour 120 patients. 76 patients n'ont pas de GVHc ou ont une forme limitée (63,3%) et 44 patients ont une forme extensive (44,4%). Selon la classification NIH, 59 patients sont évaluables, 49,2% ont une GVHc sévère.

2/ Infections

Les complications infectieuses étaient réparties de la façon suivante :

- Bactériennes : 49 patients (40,5 %), dont 28 (soit 57,1 % des patients ayant une infection bactérienne) avec sepsis à Staphylocoque à coagulase négative. La survenue du sepsis a un délai médian par rapport à la greffe de 11 jours [de J-6 à J 1401].
- Mycosiques : 16 patients (13,2 %) dont 6 (37,5%) décès.
- Virales : 112 (92,5 %) patients ont connu au moins une infection virale au décours de l'allogreffe dont 26,9% patients infectés par cytomégalovirus (CMV), 25% par Epstein Bar virus (EBV), 21,4 % par adénovirus, 11,6% par des virus respiratoires (influenza, virus respiratoire syncytial, parainfluenza...), 5,3 % par HHV6 et 5,3% par herpes simplex virus (HSV), enfin 4,5% par varicelle zona virus (VZV).

3/ Survenue de cancers secondaires

On dénombre 6 patients (5%) atteints d'un cancer lié à l'immunodépression du patient dont les 2/3 sont représentés par le PTLD.

4/ Survenue de la rechute

La rechute de la maladie initiale a concerné 24 patients (19,8 %). Son délai médian de survenue est de 217 jours soit 7 mois environ après la greffe [46-1255 jours].

II. ETUDE DE LA MORTALITE DE NOTRE POPULATION GREFFEE

A. Survie globale

1/ Description de la population.

Le suivi médian est de 21,3 mois [0,2-121,9]. La survie globale médiane est de 649 jours à la date de dernières nouvelles soit un peu plus de 21 mois. La survie globale à 1 an est de 67,7%. La survie globale à 2 ans est de 57%.

Les 3 facteurs pronostiques qui diminuent la survie globale à 1 an sont:

- Au moins une incompatibilité HLA,
- la survenue d'une GVH aiguë sévère (II-IV)
- et la survenue d'une GVH chronique extensive

La survie globale à 2 ans est diminuée par 5 facteurs pronostiques :

- l'âge, notamment la population adulte (>18ans),

- le niveau de risque (notamment les receveurs considérés à haut risque)
- l'incompatibilité HLA (au moins une incompatibilité entre donneur et receveur)
- la survenue d'une GVHa sévère
- et la survenue d'une GVHc extensive

2/ Impact des caractéristiques cliniques

Nous détaillerons la survie globale à deux ans

a. Âge receveur/donneur

La survie globale est de 72,55% pour les enfants et de 47,76% pour les adultes ($p=0,01$).

b. Délai entre le diagnostic et la greffe

La durée médiane entre le diagnostic et la greffe est de 481 jours. Nous avons retenu cette valeur pour l'évaluation de la survie. Si le délai entre le diagnostic et la greffe est inférieur à 481 jours, la survie à un an est de 67,2%. Si le délai est supérieur à 481 jours, la survie à un an passe à 63%. Par contre la survie médiane des patients ayant un délai entre le diagnostic et la greffe inférieur à 481 jours est de 585 jours à la date de dernières nouvelles contre 857 jours pour les patients avec un délai supérieur entre la greffe et le diagnostic. Ce critère d'évaluation des patients est fortement biaisé par le fait que le délai entre le diagnostic et la greffe est souvent le plus long en cas d'hémopathie non maligne. Ces patients ont une meilleure survie, entre autre grâce, entre autre, à la moindre incidence de la rechute.

c. Compatibilité HLA

Les greffés en HLA-identiques 10/10^{em} ont une OS de 62%, de 55,5% pour les 9/10^{eme} et de 0% pour les 8/10^{eme} ($p=0,01$).

d. Compatibilité ABO

Il n'y a pas de différence statistiquement significative en terme de survie entre les différents groupes de compatibilité ABO (compatible, incompatibilité mineure, majeure ou bidirectionnelle) ($p=0,78$).

e. Statut CMV

La survie à deux ans est de 57,9% pour les couples donneur et receveur CMV négatif et de 70 % pour les couples donneur et/ou receveur CMV positif ($p=0,14$).

f. Sexe receveur/donneur

La survie globale est de 58,2% pour les couples donneur-receveur hommes, de 62,5% pour les couples donneur-receveur femmes et de 52,17% lorsque le receveur est de sexe masculin et le donneur de sexe féminin ($p=0,75$).

3/ Impact des caractéristiques de la prise en charge

a. Groupe de risque

Dans le groupe des greffes à bas risque, une différence de survie est statistiquement significative à deux ans ; la survie est de 68,7% dans le groupe des greffes à bas risque versus 51,4% dans le groupe des greffes à haut risque ($p=0,03$). Notons que le diagnostic initial est un paramètre important si nous classons les leucémies aiguës et chroniques en un groupe (appelé hémopathies malignes) comparé à toutes les autres indications de greffe (appelé autre).

b. Source du greffon

La différence de survie globale si le greffon est issu de moelle osseuse ou de CSP n'est pas statistiquement significatif : survie de 53,5% en cas de greffe de CSP et de 65,9% en cas de greffe de moelle osseuse ($p=0,18$).

c. Type de conditionnement

La survie à 2 ans est de 57,5% après un conditionnement à intensité réduite, moins toxique, versus 59,6% après un conditionnement myéloablatif ($p=0,88$), la toxicité initiale d'un conditionnement myéloablatif pouvant être nivelée par le risque de rechute après un conditionnement à intensité réduite.

d. Sérum anti-lymphocytaire forte dose/faible dose

La survie à 1 an puis 2 ans des patients ayant reçu une forte dose de SAL est de 73,2% puis 59,6% versus 69,3% puis 57,6% pour les patients ayant reçu une faible dose ($p=0,83$).

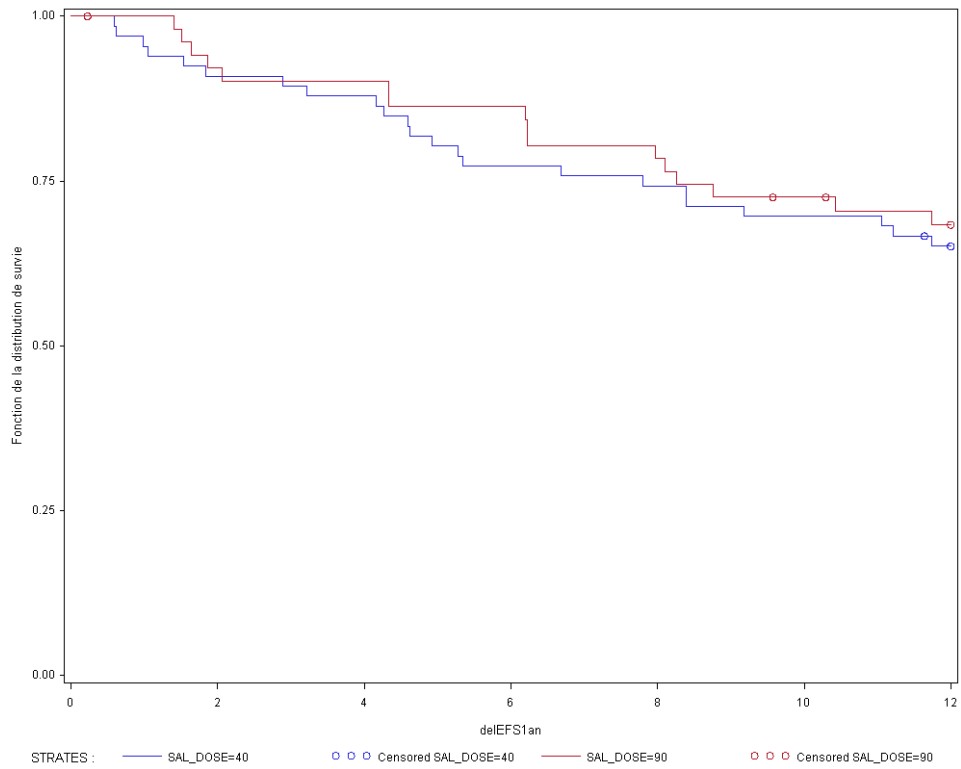


Figure 12 : Survie globale à 1 an en fonction de la dose de SAL administrée aux patients.

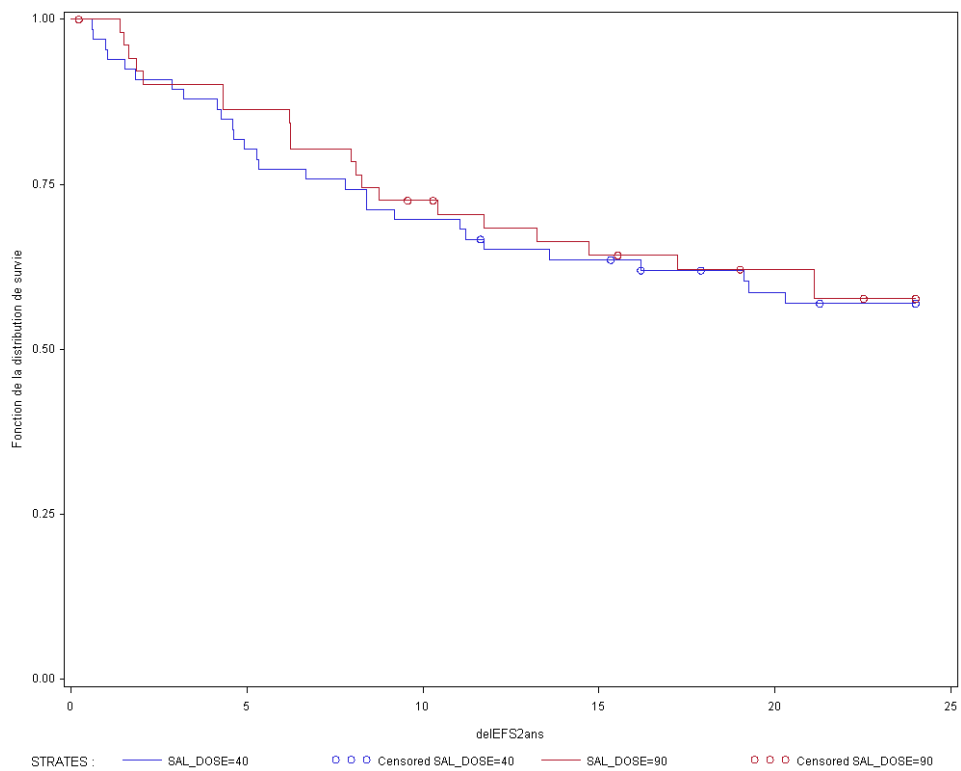


Figure 13 : Survie globale à 2 ans en fonction de la dose de SAL administrée aux patients.

4/ Impact des événements post-greffe

a. Survenue d'une GVH aiguë

On distingue deux profils différents : en l'absence de GVH aiguë ou en cas de grade I comparé à la GVH aiguë sévère de grade II-IV. La survie à deux ans est respectivement de 61,2% contre 42% ($p=0,02$). Notons qu'en cas de GVH aiguë de grade IV la survie à un an est de 0% ($p<0,0001$).

b. Survenue d'une GVH chronique

A deux ans, la survie est de 9% dans le groupe de patients qui a présenté une GVH chronique extensive, contre 62% dans l'autre groupe ($p < 0,0001$).

B. La survie sans maladie

La DFS est la survie sans rechute. Le délai médian de survenue de la rechute est de 6,2 mois [1,5-41,1]. La survie sans événement est strictement comparable à la survie globale. Nous observons que, parmi les 20,25% des patients ayant eu un événement, à l'exception de 3 patients qui ont rechuté et ne sont pas décédés au recul fixé, tous les autres sont décédés après leur rechute (courbes quasi superposables).

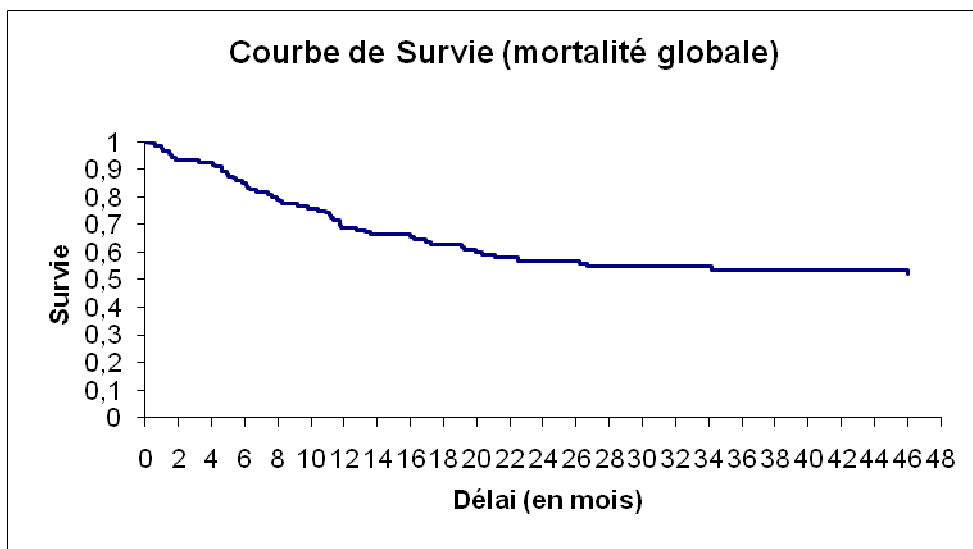


Figure 14 : Courbe de la survie globale à 2 ans.

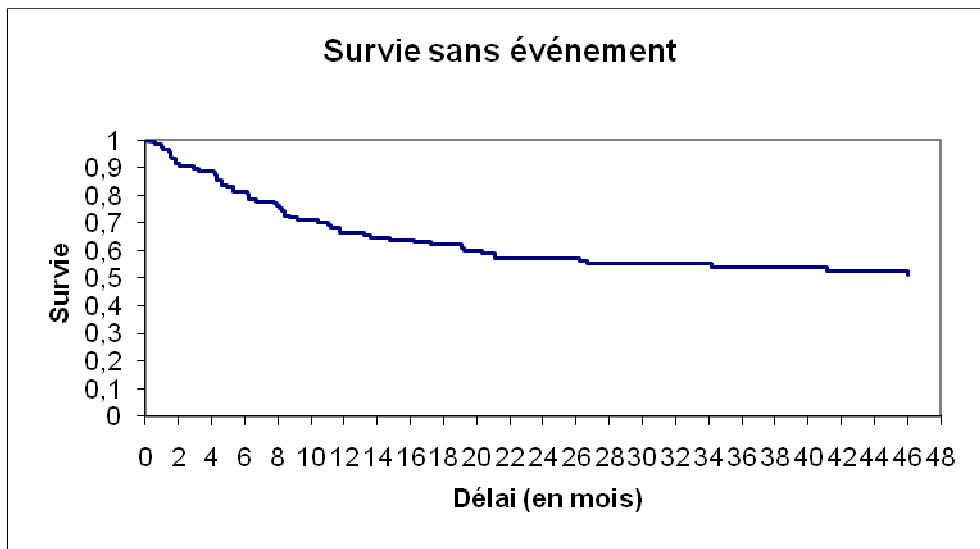


Figure 15 : Courbe de la survie sans événement à 2 ans.

C. Mortalité liée à la toxicité du traitement

1/ Mortalité liée à la toxicité du traitement

La mortalité liée à la toxicité du traitement (TRM) englobe l'ensemble des décès non liés à une rechute. Le délai médian de décès est de 8,7 mois [0,6-46]. La mortalité à 1 an est de 32,3% des patients et à 2 ans de 43%. A la date des dernières nouvelles, 56 patients de l'étude sont décédés soit 46,2%. Dans notre étude la TRM à un an est influencée par les mêmes facteurs explicatifs qu'à 2 ans. C'est pourquoi nous présentons ci-dessous les résultats de la TRM à 2 ans.

2/ Caractéristiques cliniques

a. Âge receveur/donneur

La mortalité liée à la greffe est chez l'enfant de 14% et de 32% chez l'adulte ($p=0,01$) à 2 ans post-greffe.

b. Compatibilité HLA

A deux ans de la greffe, on observe: une TRM de 19% en cas de greffe phéno-identique 10/10^{ème}, contre 35% en cas de greffe phéno-identique 9/10^{ème} et 8/10^{ème} ($p=0,05$)

c. Statut CMV

La TRM est de 50% lorsque le donneur est séronégative pour un receveur séropositif, versus 20% dans les autres couples sérologiques ($p=0,05$).

d. Maladie initiale (diagnostic)

Le diagnostic de la maladie n'influence pas la TRM qui est à 2 ans de 25% en cas d'hémopathies malignes de type leucémies aiguës et chroniques versus 24% pour toutes les autres indications de greffe ($p=0,76$).

3/ Caractéristiques de la prise en charge

a. Groupe de risque

La TRM est de 15% pour les patients à faible risque et de 31% pour les patients à haut risque ($p=0,02$).

b. Source du greffon

La TRM est de 30% en cas de greffe de CSP et de 15% en cas de greffe de moelle osseuse ($p=0,03$).

c. Type de conditionnement

Le type de conditionnement myéloablatif vs non myéloablatif n'influence pas la TRM à deux ans ($p=0,16$) de la greffe.

d. Dose de SAL

La prophylaxie de la GVH par SAL implique 29% de TRM pour les patients ayant reçu une forte dose de SAL dans le conditionnement versus 18% pour ceux ayant reçu une faible dose, ($p=0,17$).

4/ Événements post-greffe

a. Survenue d'une GVH aiguë

La TRM est de 22% en cas de GVHa de grade 0-I et de 26% en cas de GVHa sévère ($p=0,75$).

b. Survenue d'une GVH chronique

La TRM est de 19% si le patient ne présente pas de GVHc ou une GVHc limitée *versus* 35% en cas de GVHc extensive, mais cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,12$)

D. Analyse multivariée

Les variables candidates pour l'analyse multivariée sont celles significatives en analyse univariée (soit $p \leq 0,05$).

1/ Facteurs pronostiques de la survie globale à deux ans

Les facteurs indépendants de mauvais pronostic sont :

- L'âge (> 18 ans)
- Le diagnostic initial (leucémies aiguës et chroniques)
- Le niveau de risque (élevé)
- la survenue d'une GVHa sévère
- la survenue d'une GVHc extensive

Le facteur de bon pronostic est la compatibilité HLA 10/10 entre le receveur et le donneur.

Tableau II : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la survie globale.

	HR	p
Age		
Enfant	5,6 [2,4 - 13,2]	0,0001
Adulte	1	
Diagnostic		
Autre	4,1 [1,9 - 8,8]	0,0003
Hémopathie maligne	1	

Les facteurs qui ne sont pas significatifs dans ce modèle de régression de Cox multivariée sont : le niveau de risque à la greffe, la survenue de la GVHa et chronique sévères et le degré de compatibilité HLA.

2/ Facteurs pronostiques de la survie sans évènements à deux ans

Les facteurs indépendants de mauvais pronostic retenus sont les mêmes que ceux retenus pour la survie globale.

Tableau III : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la survie sans évènement.

	HR	p
Age		
Enfant	3,1 [1,6 - 6,3]	0,0014
Adulte	1	
Diagnostic		
Autre	3,7 [1,8 - 7,7]	0,0004
Hémopathie maligne	1	

Les facteurs qui ne sont pas significatifs dans ce modèle de régression de Cox multivariée sont les mêmes que dans l'analyse multivariée de la survie globale: le niveau de risque à la greffe, la survenue de la GVHa sévère et chronique extensive et le degré de compatibilité HLA.

3/ Facteurs pronostiques de la mortalité toxique à deux ans

Tableau IV : Analyse multivariée des facteurs impactant sur la mortalité par toxicité du traitement.

	HR	p
Age		
Adulte	2,9 [1,2 – 6,9]	0,0167
Enfant	1	
Greffon		
Cellules souches périphériques	3,7 [1,6 – 9]	0,0032
Moelle osseuse	1	
Niveau de risque		
Elevé	2,9 [1,2 - 7]	0,0159
Faible	1	

Les facteurs qui ne sont pas significatifs dans ce modèle de régression de Cox multivariée sont: le statut sérologique CMV donneur/receveur et le degré de compatibilité HLA.

III. LA RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST-GREFFE

A. La reconstitution immunitaire biologique

1/ Définition des normes biologiques

a. Humorale

Ig G > 8g/L

IgA > 0,9g/L

IgM > 0,6g/L

La reconstitution immunitaire humorale n'a pas pu être évaluée compte tenu du fait que les patients bénéficiant de SAL dans leur conditionnement sont des patients greffés avec des donneurs non apparentés, et qu'ils ont donc tous bénéficié d'immunoglobulines polyvalentes

en perfusions prophylactiques, de façon hebdomadaire, au décours des premiers mois post-greffe.

b. Cellulaire

-Valeur attendue des taux circulants cellulaires

* chez l'adulte :

- Lymphocytes : >1000 cellules/ μ l
- LT : 60-80 % des lymphocytes totaux ou > 1000/ μ l
- LT4 : >450/ μ l
- LT8 : >200/ μ l
- LB : >50/ μ l
- NK : >50/ μ l
- T4/T8 : >0,8

* chez l'enfant : on retient les mêmes valeurs sauf pour les lymphocytes > 1000/ μ l, LT4 > 100/ μ l, LB >200/ μ l et NK > 100/ μ l

-Valeur attendue d'une activité cellulaire : TTL PHA et PMA (cpm) >100000, TTL aspergillus et CMV (IT) > 3

2/ Récupération d'un taux lymphocytaire T normal

Notre étude déplore malheureusement de nombreuses données manquantes (n= nombre de patients) à chaque date post-greffe établie (J60, J100, J180, J360). Nous n'avons donc pas réalisé une analyse séparée de la population pédiatrique. Nous avons considéré toute la population, le seuil de normalité de chaque paramètre étant le plus haut fixé pour les deux populations.

⇒ Les lymphocytes totaux circulants ont un taux normal pour 50% des patients récupéré entre J180 et J360.

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 5% (n=4/80)
- A J100, cette probabilité est de 15,9% (n=11/69)
- A J180, elle est de 33,3% (n=21/63)
- A J360, elle atteint 62,7% (n=32/51)

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant favorablement la probabilité d'atteindre un taux de lymphocytes > 1000/ μ l sont :

- L'absence de GVHa sévère (p = 0,008), notamment à J180

- L'absence de GVHc extensive ($p = 0,0006$), notamment à J360

En analyse multivariée seule la GVHc extensive est à retenir comme influençant la reconstitution du taux de lymphocytes circulants.

⇒ Les lymphocytes T (CD3+) circulants sont considéré normaux au-delà d'un taux de 1000/ μ l

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 9,9% ($n=8/81$)
- A J100, cette probabilité est de 1,59% ($n=1/67$)
- A J180, elle est de 4,8% ($n=3/63$)
- A J360, elle atteint 0% ($n=0/50$)

Compte tenu du faible nombre de patients avec un seuil aussi élevé de LT circulants, aucun test statistique n'a été réalisé.

⇒ La reconstitution des LT4 est aussi très lente à obtenir, parmi les 121 patients, 50% ont atteint un taux de CD4 supérieur à 500/ μ l entre J180 et J360.

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 9% ($n=7/78$)
- A J100, cette probabilité est de 19,1% ($n=13/68$)
- A J180, elle est de 27% ($n=17/63$)
- A J360, elle atteint 56,9% ($n=29/51$)

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant favorablement la probabilité d'atteindre un taux de CD4 > 500/ μ l sont :

- L'âge pédiatrique ($p < 0,0001$)
- Le conditionnement non myéloablatif ($p = 0,0124$)

En analyse multivariée, seul l'âge influence la reconstitution immunitaire LT4.

⇒ La reconstitution des LT8 : 50% des patients ont atteint un taux de LT8 supérieur à 250/ μ l entre J100 et J180. La reconstitution des lymphocytes T8 est moins lente à obtenir que les LT4:

- A J60, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte CD8 >250/ μ l est de 21,8% ($n=15/76$)
- A J100, cette probabilité est de 42,6% ($n=29/68$)
- A J180, elle devient constante 60,3% ($n=38/25$)
- A J360, elle intéresse 74% des patients ($n=37/50$)

En analyse univariée, nous retenons que le diagnostique initial d'hémopathie maligne ($p=0,05$ à J100 et $p=0,0009$ à J360) et la survenue d'une GVHc extensive ($p=0,02$ à J360) ralentissent la RI des LT8. Le statut sérologique positif du donneur vis-à-vis du CMV semble amélioré à J180 la reconstitution des LT8 ($p=0,06$). Aucun facteur de risque en analyse multivariée n'a influencé la probabilité d'atteindre un taux de LT8 $>250/\mu\text{l}$ dans cette étude.

⇒ La reconstitution du ratio T4/T8:

- A J60, la probabilité d'avoir un taux ratio T4/T8 $>0,8$ est de 30,1% ($n=22/73$)
- A J100, cette probabilité est de 20,9% ($n=14/67$)
- A J180, 23,8% ($n=15/63$)
- A J360, 40% ($n=20/50$)

En analyse univariée, nous retenons que l'âge adulte ($p=0,005$ à J60 et $p=0,001$ J360), le diagnostique initial d'hémopathie maligne de type leucémie aiguë ou chronique ($p=0,002$ à J60), notamment le niveau de risque élevé ($p=0,005$ à J60 et $p=0,004$ à J360) et la survenue de GVHc extensive ($p=0,05$ à J360) ralentissent la RI du ratio T4/T8. En analyse multivariée seuls l'hémopathie maligne et le niveau de risque influencent la probabilité d'atteindre un taux T4/T8 $>0,8$ dans cette étude.

⇒ La reconstitution des LB : un taux de LB supérieur à $200/\mu\text{l}$ est atteint entre J180 et J360 pour 50% des patients.

- A J60, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte B $>200/\mu\text{l}$ est de 18,5% ($n=15/81$)
- A J100, cette probabilité est de 16,2% ($n=11/68$)
- A J180, la probabilité est de 33% ($n=21/63$)
- A J360, elle est de 62% ($n=31/50$)

En analyse univariée, les facteurs de risque diminuant la probabilité d'atteindre un taux de LB $>200/\mu\text{l}$ sont : l'âge > 18 ans ($p = 0,002$), le conditionnement myéloablatif ($p=0,06$) et la survenue d'une GVHc extensive ($p = 0,006$).

En analyse multivariée, seul l'âge et la GVHc extensive à J360 influence la reconstitution des LB.

⇒ La reconstitution NK

La reconstitution des cellules Natural Killer est la plus précoce à obtenir. Environ 50% des patients ont un taux supérieur à 100/ μ l à J60. La population de cellules Natural Killer reste majoritaire jusqu'au J100 puis garde un taux quasi constant durant les mois suivants :

- A J60, la probabilité d'avoir un taux de cellules Natural Killer >100/ μ l est de 43%
- A partir de J100 elle est de 78% +/- 11

- En analyse univariée, le facteur de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de NK >100/ μ l est :

- ✓ Le statut sérologique positif du receveur vis-à-vis du CMV (p = 0,05)

3/ Récupération d'une fonctionnalité des lymphocytes circulants

⇒ Les TTL PHA sont considérés comme positifs lorsque le résultat est > à 100000 cpm.

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 4,7% (n=4/86)
- A J100, cette probabilité est de 10% (n=8/80)
- A J180, elle est de 23,8% (n=19/80)
- A J360, elle atteint 49,1% (n=28/57)

En analyse univariée, les facteurs influençant le résultat des TTL PHA sont:

- L'âge du receveur : à J360 65,5% de la population pédiatrique a recouvré un TTL PHA > 100000 versus 32,1% dans la population adulte (p=0,01)

- La GVH aiguë sévère : dès J100, seulement 40% des patients atteints de GVHa sévère ont un TTL PHA positif *versus* 62,5% des patients atteints de GVHa grade I ou sans GVH (p=0,05). A J360, les TTL PHA sont positifs chez : 0% des patients atteints d'une GVHa grade IV, 43,3% des patients atteints de GVHa sévère et 66,7% des patients sans GVHa ou avec une GVHa de grade I (p=0,06).

- La GVHc extensive influence dès J100 la reconstitution immunitaire fonctionnelle : 25% des patients atteints ont des TTL PHA > 10000 à J100 versus 61% lorsque le receveur ne présente pas de GVH chronique ou une GVH chronique limitée (p= 0,008)

L'analyse multivariée ne retient que la GVHc extensive comme paramètre influençant la RI fonctionnelle évaluée par les TTL PHA.

Notons deux remarques à l'issue de cette étude :

1/ 45,2% des patients avec un greffon de moelle osseuse ont atteint un TTL PHA >100000 contre 53,8% avec un greffon de CSP (p= 0,51). Malgré une tendance pour une meilleure

reconstitution fonctionnelle de l'immunité lorsque le greffon est riche comme dans les CSP, cette différence avec la moelle osseuse n'est pas statistiquement significative.

2/ 60,9% des patients ayant reçu une forte dose de SAL ont recouvré un TTL PHA positif à J360 contre 41,2% des patients ayant bénéficié de SAL faible dose. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,14$).

- ⇒ Les TTL PMA sont considérés comme positifs lorsque le résultat est $>$ à 100000 cpm. Or, dans notre population, un nombre suffisant de patients pour l'étude statistique des facteurs influençant la récupération d'un TTL PMA positif, se voit à J100, soit plus rapidement que pour les TTL PHA.
- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 22,6% ($n=19/84$)
 - A J100, cette probabilité est de 39% ($n=30/77$)
 - A J180, elle est de 51,9% ($n=41/79$)
 - A J360, elle atteint 64,3% ($n=36/56$)

En analyse univariée, les facteurs influençant les TTL PMA sont:

- L'âge du receveur : la population pédiatrique récupère plus vite une fonctionnalité lymphocytaire que la population adulte : à J180 34,3% *versus* 15,6% ($p=0,05$) et à J360 65,5% *versus* 32,1% ($p=0,01$).
- La source du greffon n'influence les TTL que précocement après la greffe. A J100, 4,1% des patients avec un greffon de moelle osseuse ont atteint un TTL PMA >100000 versus 19,4% avec un greffon de CSP ($p=0,02$). Cette différence disparaît dès J180 (22,7% des patients greffés avec moelle osseuse versus 25,7% des patients avec CSP ($p=0,71$)).
- La GVH aiguë sévère ralentit la reconstitution immunitaire fonctionnelle (TTL PMA positifs à J100 pour 18,2% des patients indemnes de GVHa ou de grade I *versus* 4,3% des patients atteints de GVHa sévère ($p=0,04$). A J360, 39,5% des patients atteints d'une GVHa sévère et 61,1% des patients atteints de GVHa de grade 0-I ont un TTL PMA positif ($p=0,08$).
- La GVHc extensive influence les TTL PMA à partir de J180 : 14,7% des patients atteints de GVHc extensive ont un TTL PMA positif versus 31,1% ($p=0,08$). Cette différence devient fortement significative à J360 : 25% versus 61,1% ($p=0,008$).

En analyse multivariée, nous retenons la source du greffon à J100 et la GVHc extensive à J360.

Notons que la dose de SAL $> 60\text{mg/kg}$ semble ralentir la reconstitution immunitaire fonctionnelle lymphocytaire à J100 (7,9% des patients ayant reçu SAL 90 ont un TTL PMA

positif versus 11,9% ayant reçu SAL 40, $p=0,54$) et à J180 (16,7% des patients ayant reçu SAL 90 ont un TTL PMA positif versus 29,7% ayant reçu SAL 40, $p=0,17$). Par contre la forte dose de SAL semble au contraire améliorer le pourcentage de patient ayant une RI fonctionnelle à J360 (60,9% des patients ayant reçu 90 mg/kg de SAL ont un TTL PMA positif versus 41,2% des patients ayant reçu 40 mg/kg de SAL, $p=0,14$). Malheureusement ces données ne sont pas statistiquement significatives.

⇒ Les TTL vis-à-vis d'antigènes spécifiques comme l'Aspergillus et le CMV sont considérés comme positifs lorsque le résultat en IT >3 .

Le TTL vis-à-vis de l'aspergillus. Dans notre population, un nombre suffisant de patient récupère ce seuil de positivité vis à vis de l'aspergillus vers J360. En deçà de cette date, du fait d'un trop faible nombre de patients ayant recouvré un TTL asp positif, nous ne pouvons évaluer l'impact de facteurs capables de ralentir la RI fonctionnelle.

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 5,4% ($n=3/56$)
- A J100, cette probabilité est de 11,5% ($n=7/61$)
- A J180, elle est de 29,4% ($n=15/51$)
- A J360, elle atteint 50% ($n=20/40$)

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant favorablement la probabilité d'atteindre un TTL aspergillus IT >3 sont :

-L'âge du receveur. En effet, à J360, 70,6% de la population pédiatrique a recouvré un TTL asp positif versus 34,8% dans la population adulte ($p=0,02$)

-Le conditionnement myeloablatif ralentit la RI fonctionnelle vis-à-vis de l'aspergillus (37% des patients traités avec conditionnement myéloablatif ont un TTL asp positif contre 76,9% des patients avec conditionnement non myéloablatif) $p=0,015$.

En analyse multivariée, seul l'âge est un facteur à retenir.

Notons que 66,7% des patients ayant reçu une forte dose de SAL ont recouvré un TTL asp positif à J360 versus 40% des patients ayant bénéficié de SAL faible dose. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,10$), mais une fois de plus le SAL à forte dose semble favoriser une reconstitution immunitaire fonctionnelle à J360, très probablement par la diminution de l'incidence de la GVHc (nous le verrons ultérieurement).

Le TTL vis-à-vis du CMV est positif lorsque l'IT>3.

- A J60, la probabilité d'avoir ce taux est de 5,6% (n=4/71)
- A J100, cette probabilité est de 10% (n=7/70)
- A J180, elle est de 15,5% (n=11/71)
- A J360, elle est de 16% (8/50)

Compte tenu du trop faible nombre de patients ayant un TTL CMV positif à chaque temps, aucune analyse des facteurs influençant la reconstitution immunitaire n'a pu être appliquée.

Tableau V : Facteurs pronostics de la reconstitution immunitaire évaluée par la normalité des taux de cellules mononuclées circulantes sanguines.

Evénement	Facteurs significatifs en analyse univariée	p en multivariée	Jour post-greffe de significativité
Lymphocytes > 1000/μl	- GVH aiguë sévère - GVH chronique extensive	NS 0,0006	J360
CD3 > 1000/μl	Pas de facteur compte tenu du faible nombre de patients		
CD4 > 500/μl	- Age - conditionnement	< 10 ⁻⁴ NS	J 360
CD8 > 250/μl	- hémopathie maligne - GVHc extensive -statut sérologique CMV donneur +	NS NS NS	
Ratio T4/T8>0,8	- Age - hémopathie maligne - niveau de risque - GVHc	0,002 0,004	J 360 J 360
CD19 > 200/μl	- Age - Conditionnement - GVHc extensive	NS NS <0,0001	J 360
NK > 100/μl	- Statut sérologique CMV donneur+		

Tableau VI : Facteurs pronostics de la reconstitution immunitaire fonctionnelle.

Evénement	Facteurs significatifs en étude univariée	p en multivariée	Jour post-greffe de significativité
TTL PHA > 100000 cpm	- Age - GVH aiguë sévère (II-IV) - GVH chronique extensive	NS NS 0,008	J 100
TTL PMA > 100000 cpm	- Age - Source greffon - GVH aiguë sévère - GVH chronique extensive	NS 0,002 NS 0,008	J100 J180+360
TTL aspergillus >3 IT	- Age - Conditionnement	0,02 NS	J 360
TTL CMV >3 IT	Aucun facteur n'a été identifié	NS	

B. Cinétique de la reconstitution immunitaire en fonction de la dose administrée de SAL

1/ Leucocytes

Le taux de leucocytes circulants est indépendant de la dose de SAL, et semble équivalent dans les deux groupes étudiés.

Taux moyen leucocytes	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	4631,40/ μ l (n=43)	4021,32/ μ l (n=37)	4753,16/ μ l (n=38)	5955,86/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	4501,18/ μ l (n=34)	4086,47/ μ l (n=30)	4372,40/ μ l (n=25)	5585,91/ μ l (n=22)

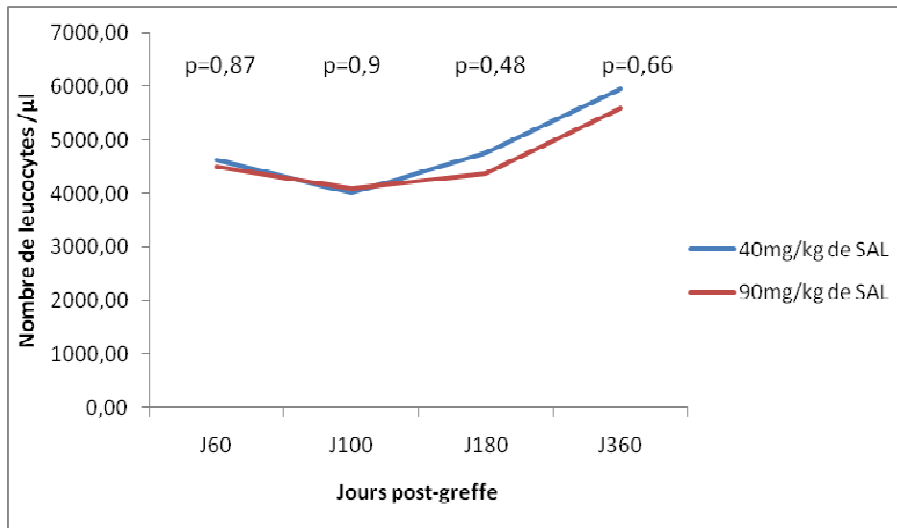


Figure 16: Reconstitution du taux de leucocytes circulants

2/ Lymphocytes

Le taux de lymphocytes circulants a tendance à être plus élevé en moyenne à J100 chez les receveurs d'une forte dose de SAL. Cette tendance s'inverse à J180. A J360, il n'y a pas de différence majeure entre les deux groupes étudiés.

Taux moyen lymphocytes	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	573,67/ μ l (n=45)	791,46/ μ l (n=39)	1139,89/ μ l (n=38)	1487,10/ μ l (n=29)
Groupe 90mg/kg de SAL	632,34/ μ l (n=35)	955,60/ μ l (n=30)	879,88/ μ l (n=25)	1353,41/ μ l (n=22)

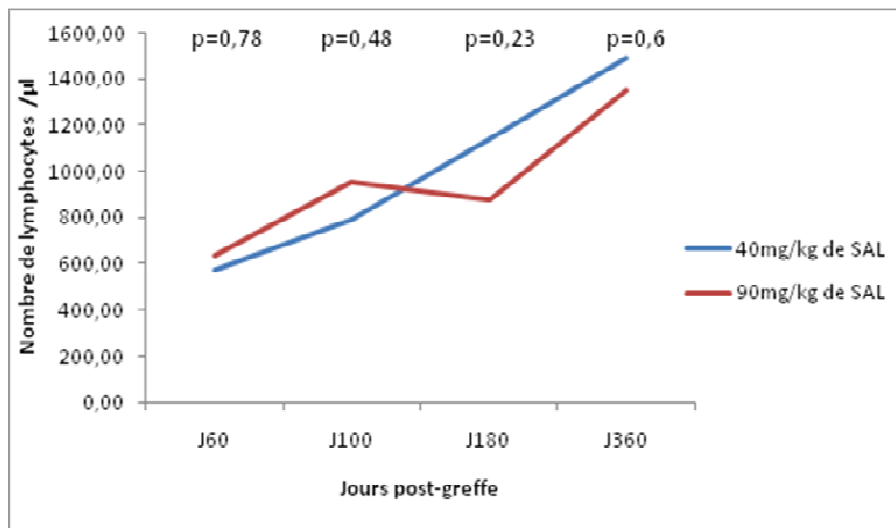


Figure 17 : Reconstitution du taux de lymphocytes circulants

3/ Lymphocytes T

Le taux de LT suit l'évolution du taux de lymphocytes totaux : plus élevé à J100 chez les receveurs d'une forte dose de SAL, cette tendance s'inverse à J180. A J360, il n'y a pas de différence majeure entre les deux groupes étudiés.

a. Totaux

Taux moyen LT	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	324,17/ μ l (n=47)	477,72/ μ l (n=39)	692,18/ μ l (n=38)	866,68/ μ l (n=28)
Groupe 90mg/kg de SAL	242,53/ μ l (n=34)	540,43/ μ l (n=28)	411,32/ μ l (n=25)	768,27/ μ l (n=22)

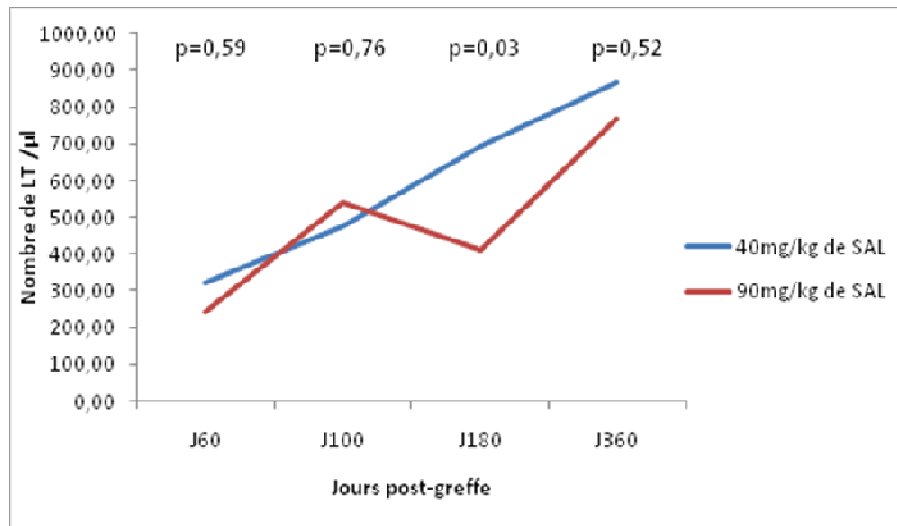


Figure 18 : Reconstitution du taux de lymphocytes T circulants

Au sein des LT, nous avons distingué les LT avec un TCR classiques $\alpha\beta$ et les LT avec un TCR $\gamma\delta$. Ces deux sous-types ont une évolution similaire aux LT totaux. On note leur taux moyen plus diminué à J60 chez les patients traités par 90mg/kg de SAL.

Taux moyen LT $\alpha\beta$	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	277,55/ μ l (n=20)	611,18/ μ l (n=22)	630/ μ l (n=27)	777,67/ μ l (n=21)
Groupe 90mg/kg de SAL	148,80/ μ l (n=15)	755,53/ μ l (n=17)	441,63/ μ l (n=16)	663,64/ μ l (n=11)

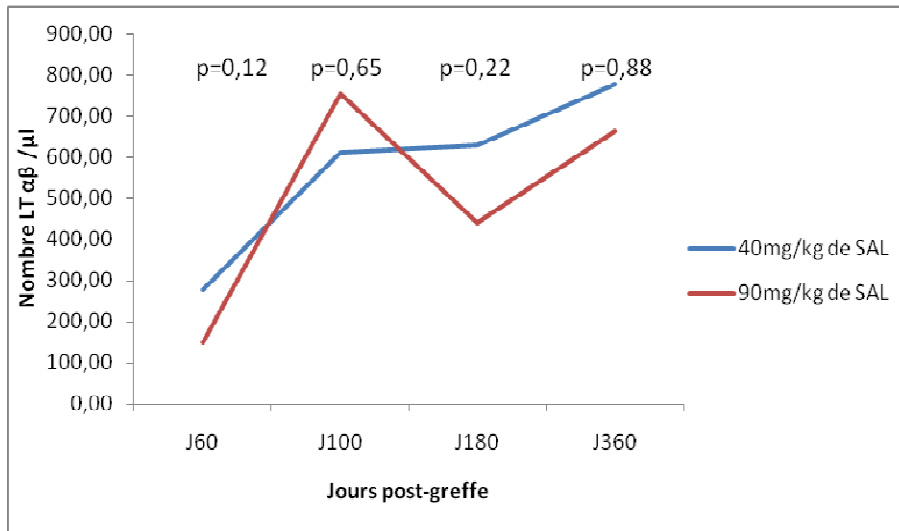


Figure 19 : Reconstitution du taux de lymphocytes T $\alpha\beta$ circulants.

Taux moyen LT $\gamma\delta$	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	13,25/ μ l (n=20)	23,76/ μ l (n=22)	35,15/ μ l (n=27)	81,60/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	5,2/ μ l (n=15)	55,53/ μ l (n=17)	28,63/ μ l (n=16)	74,45/ μ l (n=11)

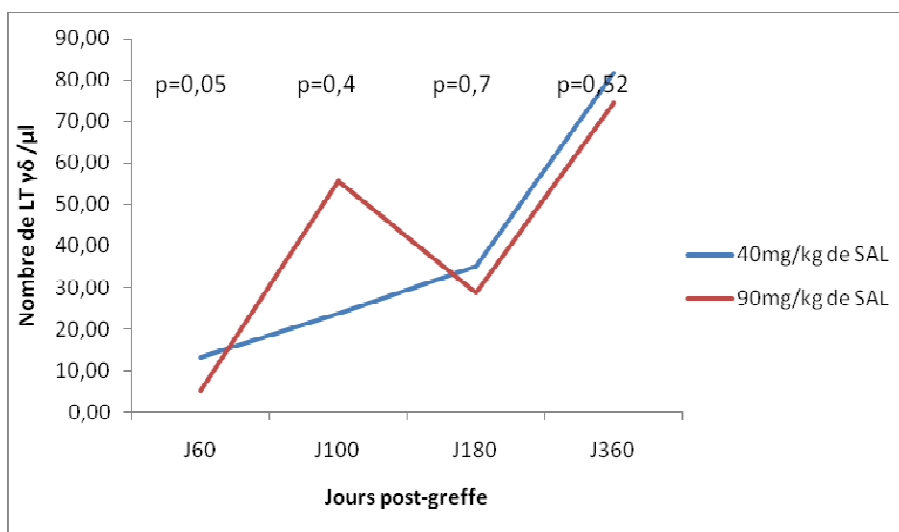


Figure 20 : Reconstitution du taux de lymphocytes T $\gamma\delta$ circulants.

b. LT4

⇒ LT4 totaux

L'évolution du taux de LT4 circulants semble ralentie chez le receveur d'une forte dose de SAL de façon constante sur les 6 premiers mois suivant la greffe. Cette différence entre les deux groupes est statistiquement significative à J180. Le taux circulant de LT4 n'atteint un taux moyen comparable dans les 2 groupes qu'à J360.

Taux moyen LT4	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	69,36/ μ l (n=44)	98,77/ μ l (n=39)	160,29/ μ l (n=38)	287,07/ μ l (n=29)
Groupe 90mg/kg de SAL	49,85/ μ l (n=34)	74,03/ μ l (n=29)	114,52/ μ l (n=25)	288,45/ μ l (n=22)

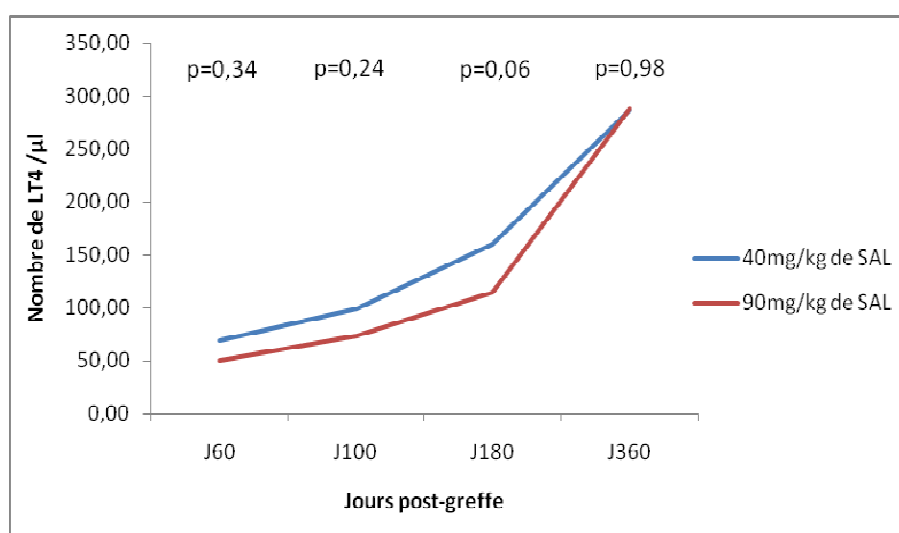


Figure 21 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 circulants.

⇒ **LT4 phénotypes activés** : Le SAL a de nombreux immunoglobulines dirigées contre les molécules de co-stimulation, prévenant ainsi l'activation des cellules immunocompétentes. Le SAL pourrait diminuer l'expression du CD28 sur les LT et sa voie de stimulation par une activité agoniste anti-CTLA4 [126]. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux LT circulants avec un phénotype activé.

LT4+ CD28+

Les LT4 avec un phénotype activé (CD28+ ou CD38+ ou HLADR+) ont des taux moyens, dans les deux groupes étudiés, quasi-comparables.

Taux moyen LT4 CD28+	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	62,16/ μ l (n=19)	92,81/ μ l (n=22)	157,96/ μ l (n=28)	253,90/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	45,13/ μ l (n=16)	85,94/ μ l (n=18)	138,53/ μ l (n=17)	184,58/ μ l (n=12)

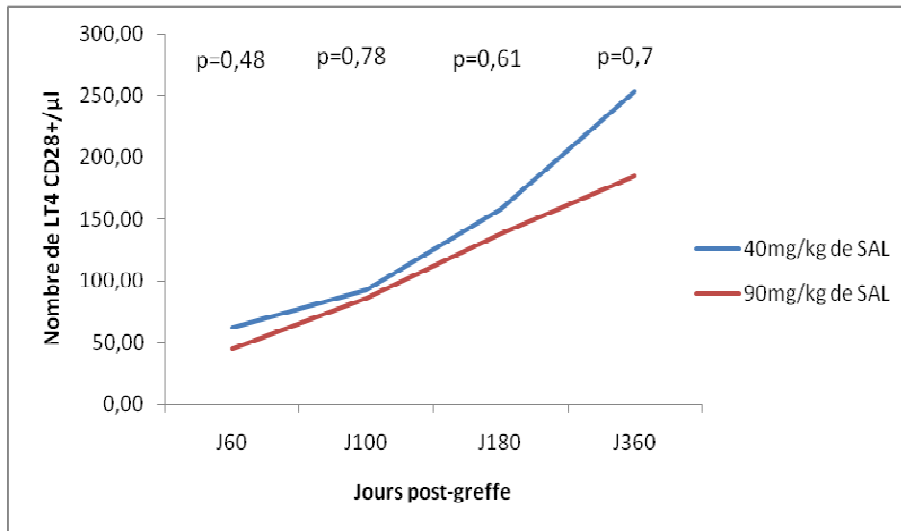


Figure 22 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 CD28+ circulants.

LT4+ CD38+

Taux moyen LT4 CD38+	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	32,16/ μ l (n=19)	53,23/ μ l (n=22)	103,00/ μ l (n=28)	196,85/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	24,31/ μ l (n=16)	67,94/ μ l (n=18)	66,35/ μ l (n=17)	176,00/ μ l (n=12)

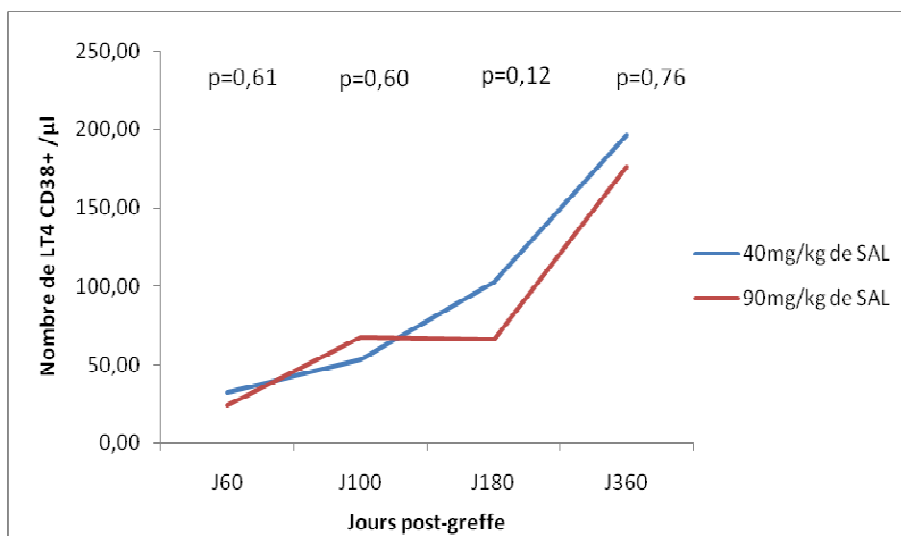


Figure 23 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 CD38+ circulants.

LT4+ HLADR+

Taux moyen LT4 HLADR+	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	40,68/ μ l (n=19)	62,77/ μ l (n=22)	53,68/ μ l (n=28)	53,80/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	30,44/ μ l (n=16)	68,50/ μ l (n=18)	63,65/ μ l (n=17)	51,17/ μ l (n=12)

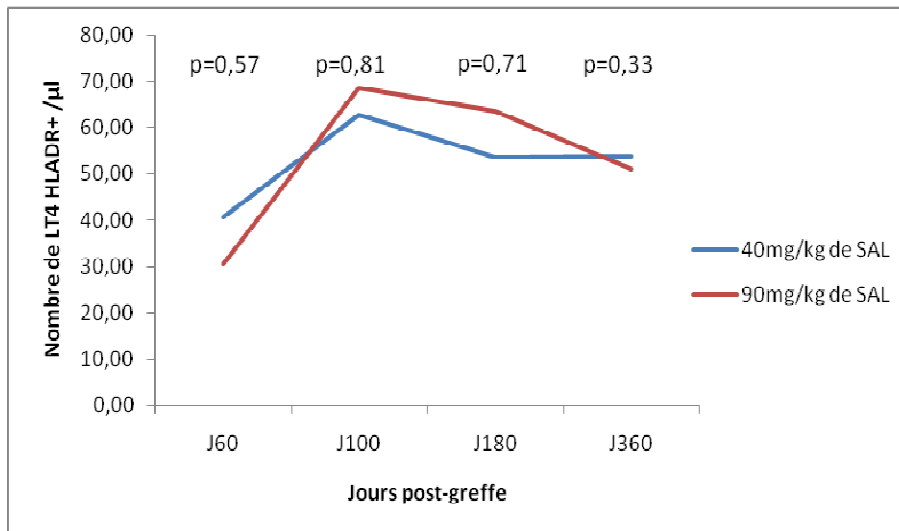


Figure 24 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 HLA-DR+ circulants.

⇒ LT4 naïfs

La reconstitution des LT4 naïfs est diminuée notamment à J180 chez les patients ayant reçu une forte dose de SAL. Cette différence disparaît voire s'inverse à J360.

Taux moyen LT4 naïfs	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	1,05/ μ l (n=20)	4,42/ μ l (n=24)	28,27/ μ l (n=30)	102,00/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	14,41/ μ l (n=17)	13,94/ μ l (n=18)	5,35/ μ l (n=17)	117,83/ μ l (n=12)

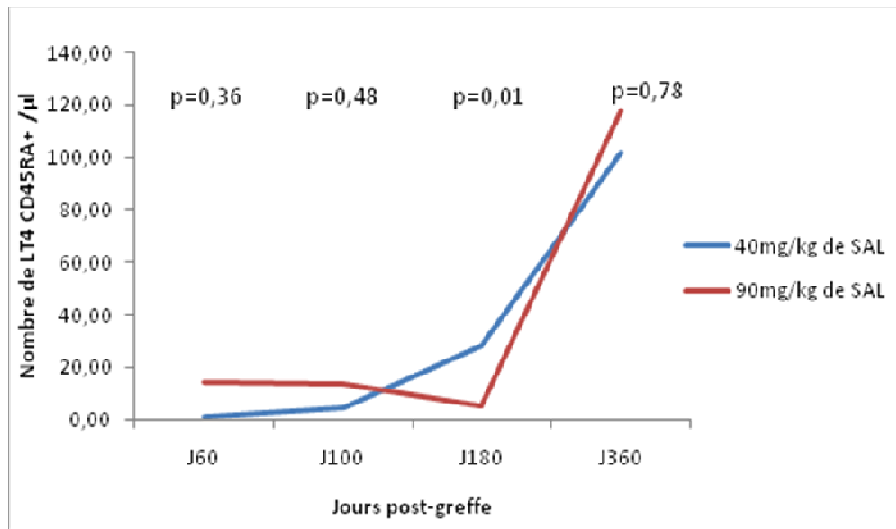


Figure 25 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 naïfs circulants.

⇒ LT4 mémoires

La récupération du taux de LT4 mémoires semble totalement indépendante de la dose de SAL administrée lors du conditionnement (n= identique au n pour les LT4 naïfs).

Taux moyen LT4 mémoires	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	87,60/ μ l	97,46/ μ l	125,43/ μ l	179,55/ μ l
Groupe 90mg/kg de SAL	58,24/ μ l	107,28/ μ l	128,18/ μ l	137,92/ μ l

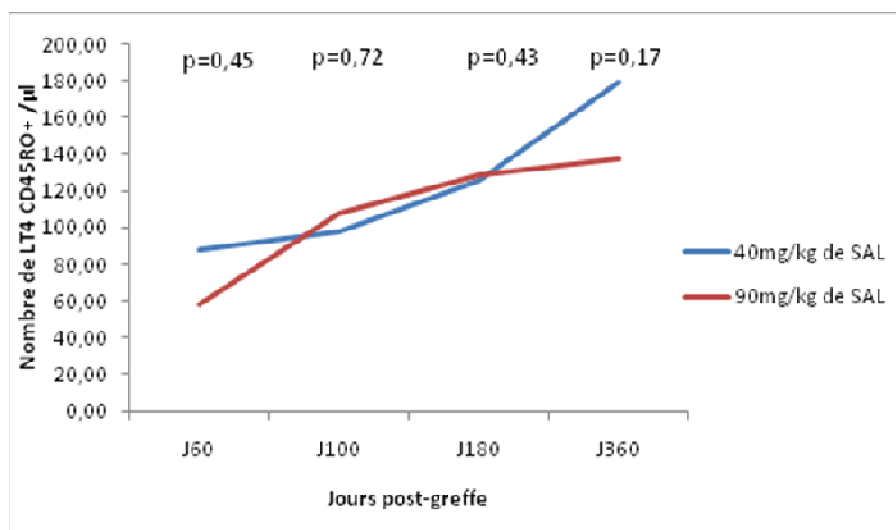


Figure 26 : Reconstitution du taux de lymphocytes T4 mémoires circulants.

c. LT8

⇒ **totaux :**

Le taux moyen de LT8 circulants est diminué chez le receveur d'une forte dose de SAL de façon statistiquement significative à partir de J180 ($p=0,02$), alors qu'à J100 ce taux semblait être plus élevé ($p=0,72$). Nous faisons la même observation pour les LT8 avec un phénotype CD28+, CD38+, HLADR+.

Taux moyen LT8	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	270,52/ μ l (n=44)	356,33/ μ l (n=39)	490,45/ μ l (n=38)	555,00/ μ l (n=29)
Groupe 90mg/kg de SAL	256,71/ μ l (n=34)	423,14/ μ l (n=29)	253,56/ μ l (n=25)	431,95/ μ l (n=21)

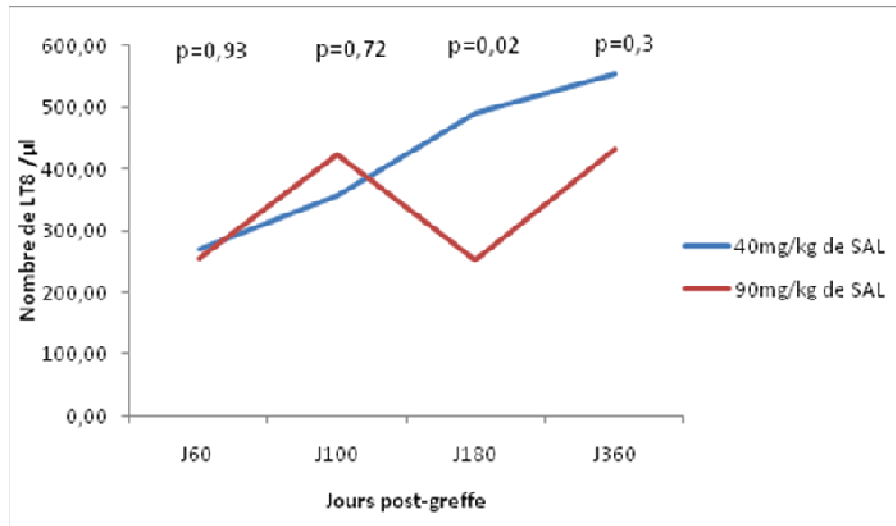


Figure 27 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 circulants.

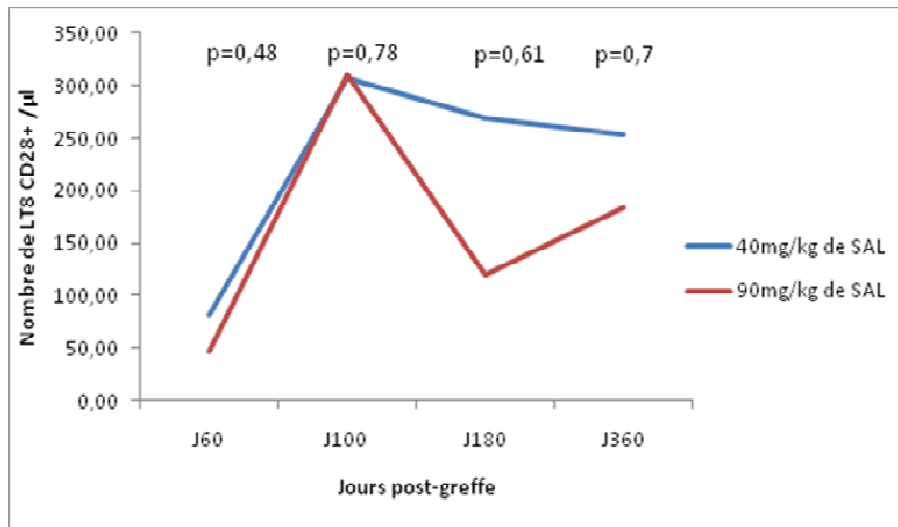


Figure 28 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 CD28+ circulants.

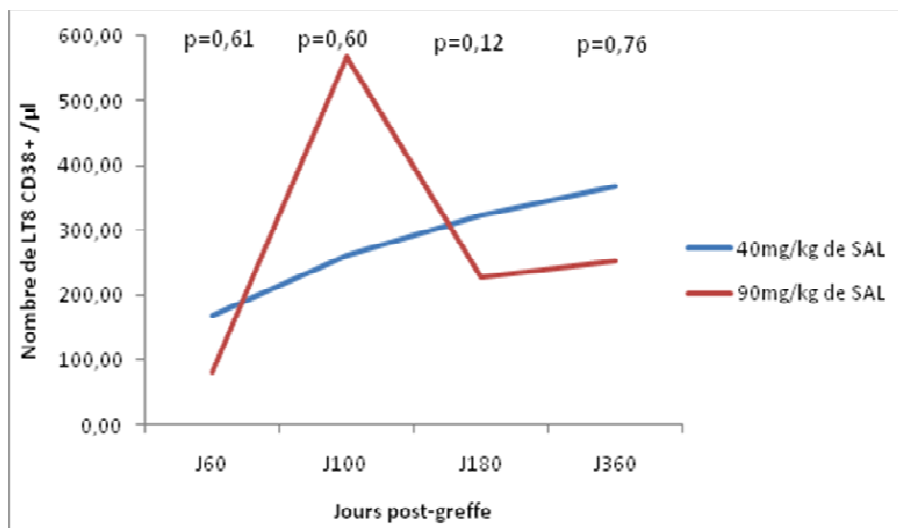


Figure 29 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 CD38+ circulants.

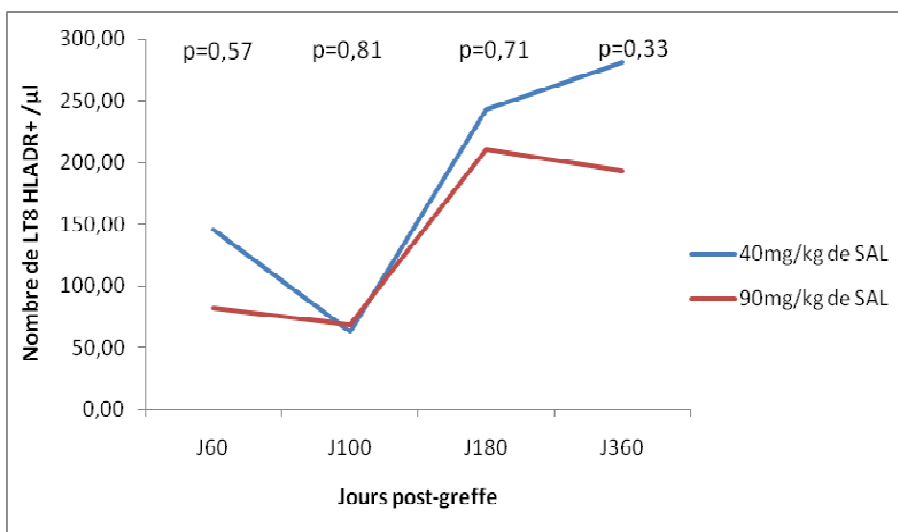


Figure 30 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 HLA-DR+ circulants.

⇒ LT8 naïfs

La reconstitution des LT8 naïfs suit la même évolution que les LT8 totaux, mais elle est statistiquement indépendante de la dose de SAL administrée lors du conditionnement.

Taux moyen LT8 naïfs	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	60,42/ μ l	90,27/ μ l	123,82/ μ l	208,80/ μ l
Groupe 90mg/kg de SAL	11,44/ μ l	199,00/ μ l	99,18/ μ l	136,50/ μ l

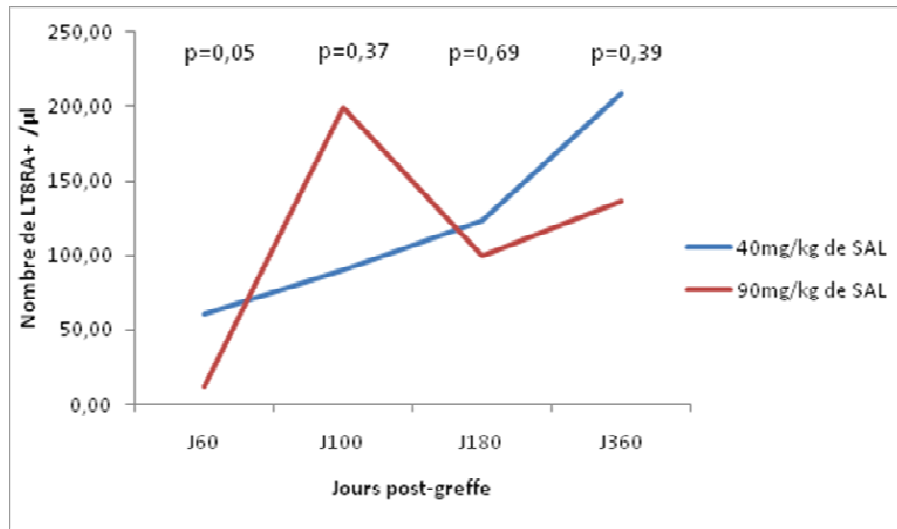


Figure 31 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 naïfs circulants.

⇒ LT8 mémoires

Le taux de LT8 mémoires augmente rapidement dans les deux groupes jusque J100, probablement par expansion homéostatique.

Taux moyen LT8 mémoires	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	173,05/ μ l (n=19)	407,27/ μ l (n=22)	242,11/ μ l (n=28)	281,45/ μ l (n=20)
Groupe 90mg/kg de SAL	76,75/ μ l (n=16)	407,67/ μ l (n=18)	178,00/ μ l (n=17)	193,67/ μ l (n=12)

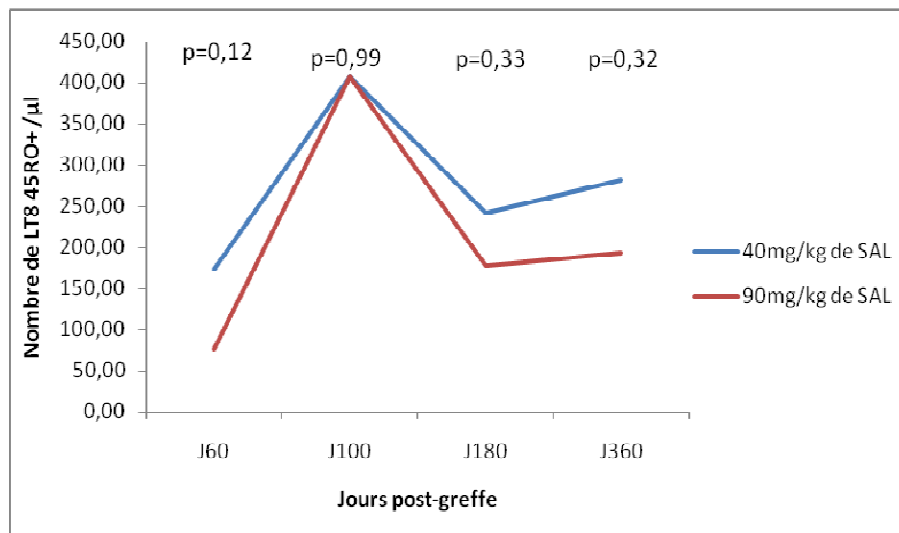


Figure 32 : Reconstitution du taux de lymphocytes T8 mémoires circulants.

d. NKT

Le taux de lymphocytes NKT circulants suit la même évolution que les LT conventionnels. Augmenté à J100 chez le receveur d'une forte dose de SAL, à J180, ce taux est inférieur au taux moyen des NKT des receveurs ayant reçu une faible dose de SAL ($p=0,08$).

Taux moyen NKT	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	23,13/ μ l (n=23)	25,43/ μ l (n=21)	35,40/ μ l (n=30)	33,26/ μ l (n=23)
Groupe 90mg/kg de SAL	14,31/ μ l (n=16)	65,15/ μ l (n=20)	17,18/ μ l (n=17)	32,62/ μ l (n=13)

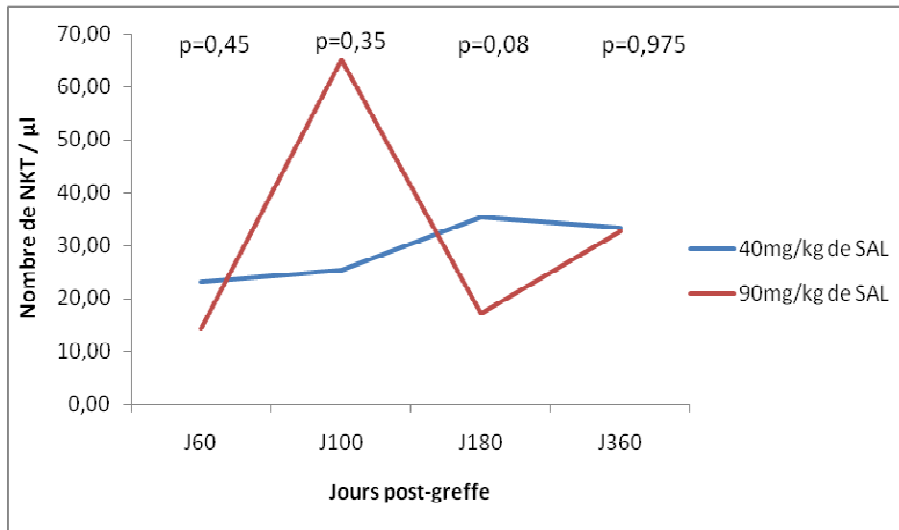


Figure 33 : Reconstitution du taux de lymphocytes NKT circulants.

4/ Lymphocytes B

La reconstitution du taux de LB circulants est diminuée en moyenne chez les patients ayant reçu la dose de 40 mg/kg de SAL, mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

Taux moyen LB	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	58,34/ μ l (n=47)	52,77/ μ l (n=39)	123,37/ μ l (n=38)	223,72/ μ l (n=29)
Groupe 90mg/kg de SAL	62,15/ μ l (n=34)	82,03/ μ l (n=29)	177,32/ μ l (n=25)	360,48/ μ l (n=21)

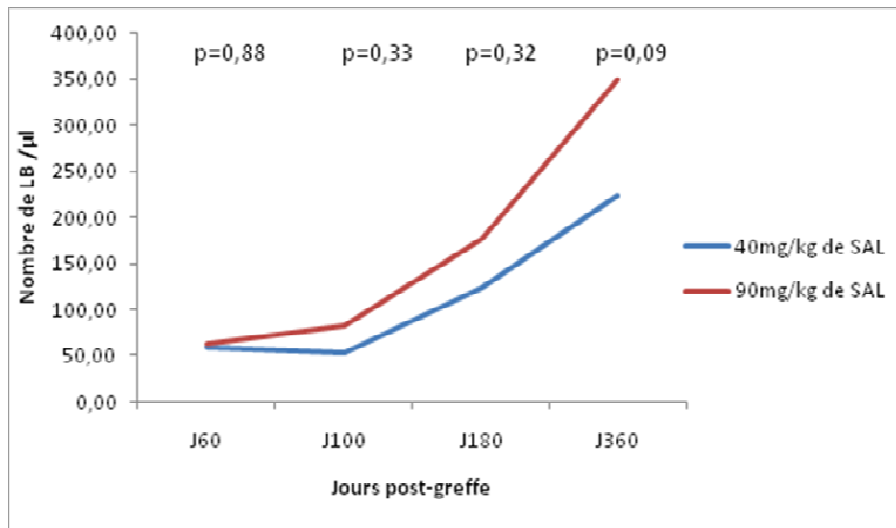


Figure 34 : Reconstitution du taux de lymphocytes B circulants.

5/ NK

Le taux de lymphocytes NK est rapidement reconstitué (avant J100). Le taux de lymphocytes NK circulants est plus élevé chez les patients ayant reçu 90mg/kg de SAL (J100, $p=0,03$), puis devient comparable dans les deux groupes.

Taux moyen NK	J60	J100	J180	J360
Groupe 40mg/kg de SAL	164,17/ μ l (n=46)	235,26/ μ l (n=38)	257,68/ μ l (n=38)	279,68/ μ l (n=28)
Groupe 90mg/kg de SAL	192,88/ μ l (n=34)	344,21/ μ l (n=29)	234,88/ μ l (n=25)	190,19/ μ l (n=21)

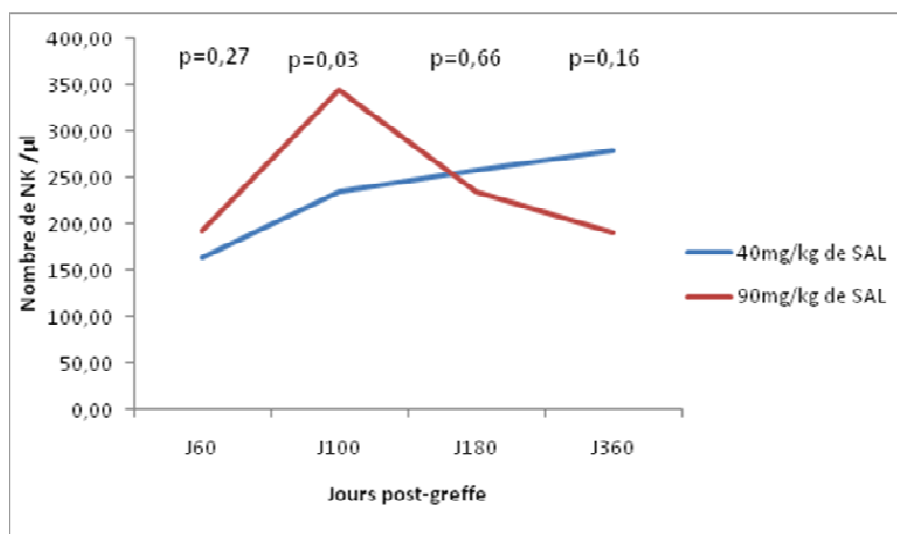


Figure 35 : Reconstitution du taux de lymphocytes NK circulants.

AU TOTAL :

Les taux des leucocytes et lymphocytes totaux circulants chez le receveur semblent indépendants de la dose de SAL administrée dans le conditionnement. Cependant, la forte dose de SAL favorise la reconstitution d'un sous-type cellulaire de l'immunité innée :

- à J100 : Lymphocytes NK ($p=0,03$)

Et ralentit la reconstitution de :

-à J180 : lymphocytes T totaux ($p=0,03$) ; notamment les NKT ($p=0,08$), les LT CD4+ de phénotype naïfs CD45RA+ ($p=0,01$) et les LT CD8+ totaux ($p=0,02$)

A J360, les moyennes des taux des lymphocytes (tous sous-type confondus) sont proches quelque soit la dose de SAL administrée.

Si l'on teste un effet "temps", on observe une évolution dans le temps du taux des lymphocytes T totaux et notamment des LT4 (naïfs) qui est statistiquement ralentie pour les patients ayant reçu une forte dose de SAL. Nous n'observons pas cet effet « temps » pour les autres types cellulaires étudiés.

C. L'incidence des infections

Les infections (bactériennes, mycotiques, parasitaires et virales) sont plus fréquentes chez les adultes 75,7% versus 43,1% chez les enfants ($p=0,0003$) et chez les receveurs CMV séropositifs greffés avec un donneur CMV séronégatif ($p<0,0001$). Pour les raisons d'une trop faible incidence d'infections mycotiques ($n=16$) nous étudierons l'impact du SAL uniquement sur l'incidence des infections bactériennes et virales.

1/ Facteurs explicatifs d'une infection bactérienne

a. Caractéristiques cliniques

- Âge receveur/donneur

L'incidence d'une infection bactérienne est de 52,9% chez l'adulte et de 23,5% chez l'enfant ($p=0,001$).

- Compatibilité HLA

L'incidence des infections bactériennes est quasi-similaire quelque soit le degré de compatibilité HLA. Ainsi, 42,5% des greffés en HLA identique 10/10^{ème} présente une infection bactérienne, 36,8% des greffes 9/10^{ème} et 33,3% des greffes 8/10^{ème} ($p=0,81$)

- Statut CMV

De façon intéressante, le statut sérologique CMV du donneur et du receveur semble influencer la reconstitution immunitaire anti-bactérienne. En effet, 45% des couples D-/R- ont présenté une infection bactérienne, 35,3% pour le couple D+/R+, 24% pour le couple D+/R-. Par contre 64% des couples à risque accru d'infection à CMV (D-/R+) ont présenté une infection bactérienne ($p=0,025$). Traités par ganciclovir, ces patients présentent souvent une neutropénie secondaire au traitement, favorable aux infections bactériennes.

- Maladie initiale

Le diagnostic d'hémopathie maligne (notamment les leucémies aiguës), probablement du fait des chimiothérapies préalables pour obtenir la rémission complète avant greffe, favorise la survenue d'infection bactérienne ($p=0,04$) comparé aux autres diagnostics.

b. Caractéristiques de la prise en charge

- Groupe de risque

Les patients à faible risque présentent moins d'infections bactériennes (37,7%) comparés aux patients à fort risque (44,2%) sans atteindre de significativité statistique ($p=0,58$)

- Source du greffon

L'incidence d'infection bactérienne est plus élevée (47,2%) pour les receveurs de moelle osseuse que pour les receveurs de cellules souches périphériques mobilisées (30,6%) ($p=0,06$).

- Type de conditionnement

Le type de conditionnement n'influence pas l'incidence d'infections bactériennes (37,7% en conditionnement myéloablatif versus 44,2% en non myéloablatif, $p=0,47$). La discrète tendance à une plus forte incidence d'infections bactériennes dans le conditionnement non myéloablatif peut s'expliquer par la présence de fludarabine souvent administrée dans ce type de conditionnement.

- Dose de SAL

La dose de SAL dans le conditionnement n'influence pas sur l'incidence des infections bactériennes (SAL 40= 40,6% versus SAL 90= 40,4%) $p= 0,98$.

c. Événements post-greffe

- Survenue d'une GVH aiguë

La survenue d'une GVHa sévère n'influence pas l'incidence des infections bactériennes. En effet, 40,8% de ces patients contre 40% des patients sans GVHa ou avec une GVHa de grade I ont présenté dans l'année une infection bactérienne ($p=0,92$)

- Survenue d'une GVH chronique

La GVHc extensive augmente le risque d'infections bactériennes chez 59,1% des patients contre 28,9% des patients présentant soit pas de GVHc soit une forme limitée ($p=0,0012$).

2/ Facteurs explicatifs de la survenue d'une infection virale

a. Caractéristiques cliniques

- Âge receveur/donneur

L'incidence d'une infection virale est de 64,3% chez l'adulte et de 64,7% chez l'enfant ($p=0,96$). Cependant, lorsqu'on étudie dans le détail l'incidence des infections virales, l'incidence des infections à adénovirus est supérieure dans la population pédiatrique : 25,5% des enfants greffés présentent au moins une infection à adénovirus contre 15,7% des adultes ($p=0,01$).

- Le statut sérologique D/R CMV

De façon attendue le statut sérologique du couple R/D impacte sur l'incidence d'infections virales notamment CMV, avec 76% d'infections virales pour le couples D-/R+ versus 44% pour un autre couple, par exemple D+/R- ($p=0,05$).

- Compatibilité HLA

La compatibilité HLA n'influence pas la survenue de complications infectieuses virales dans notre population (HLA identique 10/10^{ème} : 62,5%, 9/10^{ème} 68,4% et 8/10^{ème} 66,7%) $p=0,81$.

- Maladie initiale

Le diagnostic initial n'influence pas la survenue d'infection virale ($p=0,49$).

b. Caractéristiques de la prise en charge

- Groupe de risque

Les patients à haut risque ne font pas plus d'infections virales que les patients à faible risque (60,3% versus 70% ; $p=0,23$)

- Source du greffon

L'incidence d'infections virales est similaire chez les receveurs de moelle osseuse (68,1%) que chez les receveurs de CSP (59,2%) $p=0,31$.

- Type de conditionnement

L'incidence des infections virales est similaire pour les patients ayant bénéficié d'un conditionnement myéloablatif : 62,3% *versus* 67,3% pour le conditionnement NMA ($p=0,57$).

- Dose de SAL

La dose de SAL dans le conditionnement ne modifie pas l'incidence globale des infections virales (SAL40 63,8% *versus* SAL90 65,4%) $p=0,85$. Cependant, 32,7% des patients ayant reçu une forte dose de SAL ont au moins une infection à EBV contre 15,7% des patients ayant reçu une faible dose de SAL ($p=0,04$). De même 26,9% des patients ayant reçu une forte dose de SAL ont au moins une infection à adénovirus contre 14,5% des patients ayant reçu une faible dose de SAL ($p=0,07$).

c. Événements post-greffe

- Survenue d'une GVH aiguë

La GVHa sévère accroît l'incidence des infections virales (71,8% des patients *versus* 54%) $p=0,04$. Ce résultat se vérifie de façon statistiquement significative notamment vis-à-vis de l'adénovirus . 29,6% des patients atteints de GVHa sévère présentent au moins une infection à adénovirus contre 6% des patients ayant soit pas de GVHa soit une GVHa grade I ($p=0,0004$).

- Survenue d'une GVH chronique

La GVHc extensive ne semble pas favoriser la survenue d'infections virales globales (67,2% *versus* 61,1%) $p=0,49$. Cependant, vis-à-vis de l'adénovirus 36,4% des patients atteints de GVHc sévère présentent une infection contre 10,5% des patients n'ayant pas de GVHc ou une GVHc limitée ($p=0,0006$).

D. L'incidence de la GVHa

1/ Définition

La GVH aiguë survient classiquement dans les 100 premiers jours après la greffe. Le diagnostic est présumé sur les symptômes cliniques et confirmé par les biopsies de l'organe cible (essentiellement la peau, le tube digestif, le foie, le poumon). Elle engage le pronostic vital lorsqu'elle est dite sévère (du stade II à IV).

2/ Facteurs explicatifs

a. Caractéristiques cliniques

- Âge receveur/donneur

De façon inattendue, il n'y a pas de différence significative dans notre échantillon en terme d'incidence de la GVHa sévère entre la population pédiatrique (55%) et la population adulte (62,5%, $p=0,43$)

- Compatibilité HLA

On remarque une incidence diminuée de la GVHa sévère lorsque la compatibilité HLA receveur-donneur est en 10/10. 53,8% des patients greffés en compatibilité HLA 10/10 sont atteints de GVHa sévère contre 68,3% des patients greffés en compatibilité HLA 9/10 ou 8/10 ($p=0,01$).

- Maladie initiale

Le diagnostic initial n'influence pas la survenue de GVHa sévère ($p=0,31$)

b. Caractéristiques de la prise en charge

- Groupe de risque

Le groupe de risque au moment de la greffe n'influence pas l'incidence de la GVHa sévère (56,3% pour le groupe de faible risque et 60,3% pour le groupe de haut risque) $p=0,66$.

- Source du greffon

La source du greffon n'influence pas l'incidence de la GVHa sévère : 61,1% des receveurs de greffons de moelle osseuse versus 55,1% des receveurs de CSP ($p=0,51$).

- Type de conditionnement

Le conditionnement influence de façon statistiquement significative l'incidence de la GVHa sévère: 47,8% des patients traités avec un conditionnement atténué *versus* 73,1% des patients traités avec un conditionnement myéloablatif (p=0,0047).

- Dose de SAL

La dose de SAL dans le conditionnement est indépendante de l'incidence de la GVHa sévère : 58% des patients ayant reçu 40 mg/kg de SAL et 59,6% des patients ayant reçu 90 mg/kg de SAL sont atteints de GVHa sévère (p=0,85).

E. L'incidence de la GVHc

1/ Définition

La GVH chronique, survenant classiquement au delà des 100 premiers jours après la greffe a des manifestations très variables d'un patient à l'autre. Le diagnostic est présumé cliniquement (symptômes ressemblant à certaines maladies auto-immunes) et confirmé histologiquement sur des biopsies de l'organe cible.

2/ Facteurs explicatifs

a. Caractéristiques cliniques

- Âge receveur/donneur

Comme attendu, la population pédiatrique a une incidence diminuée de la GVHc extensive (26% des patients) comparée à la population adulte (44%) p=0,03.

- Compatibilité HLA

Lorsque la compatibilité HLA est de 10/10 entre le donneur et le receveur, 31,6% des patients sont atteints de GVHc extensive contre 46,3% pour les couples D/R avec au moins une incompatibilité HLA (p=0,10).

- Maladie initiale

Le diagnostic initial n'influence pas la survenue de la GVHc : 38,9% des patients greffés pour leucémies (aiguës ou chroniques) et 34,8% des patients greffés pour d'autres indications (p=0,65).

b. Caractéristiques de la prise en charge

- Groupe de risque

38,3% des patients ayant une greffe de haut risque ont une GVHc extensive et 35,6% des patients ayant une greffe de faible risque ($p=0,76$).

- Source du greffon

Les patients greffés de moelle osseuse présente la même incidence de la GVHc extensive (38%) que les patients greffés avec des CSP (34,7%) $p=0,7$

- Type de conditionnement

Comme pour la GVHa, le conditionnement myéloablatif est plus pourvoyeur de GVHc (45,1% des patients) comparés au conditionnement non myéloablatif (30,4%) $p=0,09$.

- Dose de SAL

La dose de SAL n'influence pas l'incidence de la GVHc extensive: 39,1% des patients ayant reçu du SAL à 40mg/kg *versus* 33,3% des patients traités avec 90 mg/kg de SAL ($p=0,5$). Par contre elle l'incidence la GVHc sévère (selon la classification NIH) : 29,2% des patients conditionné avec du SAL à la dose de 90mg/kg contre 62,9% des patients ayant bénéficié de SAL à 40mg/kg ($p=0,01$).

c. Événements post-greffe

En accord avec la littérature, la survenue d'une GVH aiguë augmente la probabilité d'une GVHc sévère à 48,6% *versus* 20% des patients sans GVHa préalable ($p=0,001$).

F. L'incidence de la rechute

1/ Définition

La plupart des rechutes surviennent dans les 2 ans qui suivent la greffe, sur les cellules de l'hôte. Elle peut être moléculaire, caryotypique, cytologique ou clinique.

2/ Facteurs explicatifs

a. Caractéristiques cliniques

- Âge receveur

La population pédiatrique présente moins de rechute (13,7%) que la population adulte (24%), mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

- Compatibilité HLA

L'incompatibilité HLA entre donneur et receveur semble ne pas être en faveur d'une moindre rechute dans notre échantillon, qui est de l'ordre de 19% ($p=0,94$)

b. Caractéristiques de la prise en charge

- Groupe de risque

La catégorisation en faible et haut risque n'est pas liée à une moindre rechute ou non. Celle –ci est dans les deux groupes de l'ordre de 19% $p=0,8$.

- Source du greffon

Les patients greffés avec des CSP présentent pour 24,5% d'entre eux une rechute contre 16,7% des patients greffés avec moelle osseuse, sans que cette différence soit statistiquement significative ($p=0,29$)

- Type de conditionnement

Le conditionnement myéloablatif est associé à une plus forte proportion de patients en rechute 27,5% contre 9,6% chez les patients ayant bénéficié d'un conditionnement non myéloablatif, $p=0,01$.

- Dose de SAL

La dose de SAL dans le conditionnement n'influence pas la rechute qui est de 17,4% chez les patients ayant reçu la dose de 40mg/kg versus 23,1% chez les patients ayant reçu la dose de 90 mg/kg ($p=0,44$).

3/ Événements post-greffe

- Survenue d'une GVH aiguë

L'absence de GVHa semble plus liée à la rechute puisque 24% des patients rechutent contre 16,9% des patients atteints de GVHa mais cette tendance n'est pas significative statistiquement ($p=0,33$).

- Survenue d'une GVH chronique

La GVHc semble prévenir la rechute qui est de 23,7% si le patient est indemne de GVHc versus 13,6% en cas de GVHc, mais sans que cette différence n'atteigne une pertinence statistique $p=0,17$.

Tableau VII : Analyse multivariée des facteurs influençant les conflits immunologiques

Conflits immunologiques	Analyse univariée	Analyse multivariée
GVHa sévère	Conditionnement MA	Conditionnement MA
GVHc extensive	Age Conditionnement MA GVHa	Age Conditionnement MA GVHa
GVHc sévère	Age Dose SAL GVHa	Age Dose SAL 40 GVHa
Rechute	Conditionnement NMA Diagnostic leucémie	Conditionnement NMA Diagnostic leucémie

Au total, en analyse multivariée, nous retenons les mêmes paramètres qu'en analyse univariée.

Tableau VIII : Comparaison du devenir de la population ayant reçu 40mg/kg de SAL versus la population ayant reçu 90mg/kg de SAL.

Paramètres	40mg/kg de SAL (n=69)	90mg/kg de SAL (n=52)	p=
Rechute	17,4%	23,1%	0,44
Rejet	5%	1%	NS
GVH aiguë			
Globale	71%	71%	0,9
Sévère (grade II-IV)	58%	59%	0,85
Sévère (grade III-IV)	10,1% (n=7)	9,6% (n=5)	NS
GVH chronique			
Globale	67%	46%	0,85
Extensive	39,1%	33%	0,51
Sévère (classification NIH)	62,9%	29,2%	0,01
Infections bactériennes	40,6%	40,4%	0,98
Infections virales			
Globales	63,8%	65,4%	0,85
EBV	15,9%	32,7%	0,02
CMV	29%	21,2%	0,32
Adénovirus	14,5%	26,9%	0,07

DISCUSSION

Depuis la première transplantation de CSH avec donneur non apparenté, réalisée avec succès en 1980 [127], le nombre des indications de ce type de greffe n'a cessé de croître. A ce jour, au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, les allogreffes de CSH issues de donneur non apparenté sont les greffes le plus souvent réalisées. Les limites de ces greffes ont été largement décrites dans les années 90 du fait des conflits immunologiques hôte-receveur majorés (incidence plus élevée du rejet de la greffe, de la GVH aiguë et chronique sévères et lenteur de la reconstitution immunitaire biologique avec survenue d'infections opportunistes fréquentes et fatales) [128]. Les résultats de ces greffes se sont considérablement améliorés grâce aux techniques de biologie moléculaire pour le typage HLA et ainsi une meilleure définition de la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur, mais aussi grâce à l'emploi de déplétion T du greffon *ex vivo* ou *in vivo* [129].

Notre étude a inclus 121 patients allogreffés de CSH issues de donneurs non apparentés sur une période de 10 ans. Pendant cette période, les stratégies de détermination de la compatibilité HLA receveur-donneur, la prise en charge de la prophylaxie de la GVH et la prophylaxie infectieuse ont été comparables. Par contre, certains paramètres connus pour influencer la GVH, la GVL et la reconstitution immunitaire sont très hétérogènes (âge, conditionnement...). Le nombre de patients dans notre population ne nous a pas permis d'apparier les patients selon ces paramètres. Malgré cette hétérogénéité, les deux groupes de patients (ceux ayant reçu 40mg/kg de SAL *versus* ceux ayant reçu 90mg/kg) sont restés homogènes : l'âge, le conditionnement, la source du greffon et sa richesse, le diagnostic initial et le niveau de risque au moment de la greffe étaient répartis de façon équivalente dans les deux groupes.

Il faut aussi citer les limites d'une étude rétrospective. La décision de la dose de SAL administrée s'est faite de façon non randomisée. L'impact de la dose de SAL sur le devenir du patient est à interpréter avec la notion que cette dose a été déterminée par le clinicien, en fonction des paramètres pré-greffe du patient. Par ailleurs, l'étude s'accompagne de nombreuses données manquantes biologiques et parfois des prélèvements réalisés à +/- 10 jours de la date retenue (J60+/-10, J100+/-10, J180+/-10 et J360+/-10). Cependant, notre étude apporte plusieurs enseignements sur l'impact de la dose de SAL sur la survie des patients, et sur les conflits immunologiques.

I. MORTALITE

Selon la littérature, la dose et le moment de l'administration du SAL par rapport à la greffe ont un impact significatif sur le devenir des patients allogreffés de CSH issues de donneurs non apparentés. C'est d'ailleurs dans ce contexte d'allogreffe de CSH non apparentées que l'impact positif du SAL administré lors du conditionnement a été bien documenté comme diminuant l'incidence et la sévérité de la GVHa et la GVHc [130]. Par contre, la répercussion de la dose utilisée de SAL est controversée sur la survie des patients [104, 131]. Ainsi, pour les thymoglobulines, une dose optimale entre 6 et 8mg/kg a été identifiée et recommandée en fonction d'un schéma précis d'administration [106] [117, 132] [112]. Par contre, les quelques études sur la dose administrée de SAL-Fresenius et ses conséquences sur la survie des receveurs d'allogreffe de CSH non apparentées sont contradictoires. Dans une étude rétrospective étudiant des patients atteints de LMC [119], recevant une allogreffe de CSH issues de donneurs non apparentés, la survie globale (OS) et la survie sans maladie (DFS) étaient meilleures chez les patients recevant du SAL à une dose supérieure à 60mg/kg comparé à ceux recevant moins de 60mg/kg. Ceci était en partie expliqué par une moindre incidence de la GVHa et une tendance à une moindre GVHc sans augmenter la rechute. Mais il est à noter que parmi les 31 patients ayant bénéficié du SAL à une dose inférieure à 60mg/kg, 18 recevaient une dose de 40mg/kg et 11 recevaient seulement 20mg/kg. Cette répartition hétérogène dans le groupe SAL<60mg/kg pouvait expliquer le devenir sombre de ces patients par morbi-mortalité due à la GVHa. Cependant, du fait de ces résultats, le SAL-Fresenius à une dose de 60mg/kg (ou plus) a été recommandé dans le conditionnement d'allogreffe de CSH non apparentée. Une étude plus récente menée par une équipe allemande, a montré que la mortalité liée à la greffe (TRM) est en fait plus élevée dans le groupe recevant plus de 60mg/kg, par une incidence et une sévérité plus élevée d'infections opportunistes fatales. La dose de SAL inférieure ou égale à 40mg/kg semblait, selon cette étude, permettre une meilleure DFS [118]. Notre étude a mis en évidence, en analyse multivariée, des facteurs de risques liés à la survie (OS, DFS et TRM) déjà démontrés dans la littérature. D'une part, la population pédiatrique a une meilleure survie globale, une meilleure survie sans rechute. La moindre incidence de la TRM est le reflet d'une GVH aiguë et chronique plus rare et souvent moins sévère chez l'enfant, notamment par une meilleure thymopoïèse. De même, de façon attendue, le diagnostic de leucémie (aiguë ou chronique surtout de niveau de risque élevé), à l'opposé des lymphomes, myélomes, et autres pathologies médullaires non malignes, diminue la survie globale, notamment par l'incidence augmentée de la rechute. Par ailleurs, le greffon de cellules souches

mobilisées (CSP) est associé à une TRM plus élevée que le greffon de moelle osseuse. Il faut discuter probablement l'augmentation de l'incidence de la GVH chronique extensive chez les patients greffés avec des CSP. Une autre explication est que le greffon de cellules souches mobilisées est souvent injecté après un conditionnement non myéloablatif dans notre étude. Ce conditionnement comprend de la fludarabine qui peut entraîner une immunodépression plus marquée que les autres chimiothérapies utilisées pour le conditionnement et donc favoriser les infections ($p=0,03$). Ceci étant, notre étude ne révèle aucune corrélation entre la dose de SAL administrée lors du conditionnement de la greffe et l'OS, la TRM et la DFS. Nous pouvons donc conclure, selon notre étude, qu'il n'y a pas d'avantage à administrer une forte dose de SAL-Fresenius pour la survie des patients greffés avec un donneur non apparenté.

II. LES COMPLICATIONS IMMUNOLOGIQUES

Une des premières études à avoir mis en évidence l'impact du SAL sur la RI est l'étude effectuée sur une population pédiatrique à l'hôpital Robert Debré [123]. Elle a montré un ralentissement de la reconstitution immunitaire des lymphocytes T notamment les LT4 et les lymphocytes B dans le groupe ayant reçu une forte dose de SAL (thymoglobulines, Sangstat 15mg/kg versus 7,5mg/kg). L'étude de Fehse [124], s'est intéressée plus particulièrement au SAL-Fresenius. Le SAL administré à 60-90mg/kg comparativement à l'absence de SAL dans le conditionnement était associé à un retard de la reconstitution des LT4. Les LT4 naïfs avaient un taux circulant reconstitué plus de 2 ans après la greffe. Les LB et les LT8 étaient aussi diminués avec une reconstitution atteinte plus de 3 et 8 mois respectivement après la greffe. Aux vues d'une incidence plus élevées d'infections opportunistes chez les patients recevant une forte dose de SAL-Fresenius (plus de 60mg/kg), dont un plus grand pourcentage d'entre elles mortelles, d'autres études ont supposé que la reconstitution immunitaire de ces patients était ralentie de façon dose-dépendante [114]. C'est pourquoi, nous nous sommes proposés d'étudier l'impact réel que le SAL Fresenius avait sur la reconstitution immunitaire post-greffe évaluée sur deux plans :

1/Point de vue biologique :

- Etude des taux circulants de l'immunité cellulaire
- Etude de la fonctionnalité des cellules de l'immunité

2/Point de vue clinique :

- Incidence du rejet de greffe

- Incidence sur la GVHa et GVHc
- Incidences des infections bactériennes, virales, mycotiques
- Incidence de la rechute

A. Le déficit immunitaire

1/ Biologique

La reconstitution des différents sous-types cellulaires immunitaires après l'allogreffe de CSH se fait à différents temps. Elle est sous l'influence plus ou moins du profil cytokinique du receveur (notamment pour le système immunitaire inné), de l'expansion homéostatique des cellules immunitaires et de la thymopoïèse (pour le système immunitaire adaptatif).

Schématiquement, nous rappelons :

- Après la greffe, il suit une période d'agranulocytose dite d'aplasie médullaire, pour laquelle les PNN récupèrent un taux suffisant (selon la littérature) : à 14 jours lors d'une greffe de CSP, à 21 jours en cas de greffe de moelle et approximativement à 30 jours lors des greffes de sang placentaire. Dans notre étude, le délai de prise de greffe était similaire dans les deux groupes (médiane de 18 jours dans le groupe SAL 40 et 20 jours SAL90, p=NS) et le taux moyen de leucocytes n'est pas influencé par la dose de SAL administrée toute l'année suivant la greffe.

- Les 100 premiers jours après la greffe sont caractérisés par un déficit en immunité cellulaire notamment par un taux réduit des LT cytotoxiques : les lymphocytes NK et LT CD8+. Cette période est donc à haut risque d'infections virales et fongiques. La récupération du taux normal des lymphocytes T circulants se fait tout d'abord par l'expansion périphérique des LT mémoires en réponse aux cytokines et la présence d'allo-antigènes. Puis, le relais se fait par la production effective de thymocytes matures. Cette cinétique est notamment vraie pour les LT4. Le taux de LT4 notamment de phénotype naïf (dépendant de la production thymique) se reconstitue plus tard que celui des LT8, ce qui entraîne une inversion du ratio CD4/CD8 les premiers mois après la greffe. Notre étude de la cinétique de la reconstitution immunitaire par l'étude des taux circulants des différents lymphocytes T, B et NK mais aussi du ratio CD4/CD8 n'a pas mis en évidence de différence entre le groupe ayant reçu 40mg/kg et celui ayant reçu 90mg/kg de SAL. Mais nous le savons, ce n'est pas parce le taux de LT atteint un taux satisfaisant (par exemple $LT4 > 500/\mu l$) avec la même cinétique dans les deux groupes, qu'il n'y a pas de différences importantes au sein de ces taux qui restent longtemps inférieurs à la

normale. En effet, un taux particulier de LT4 peut conditionner l'incidence de telle ou telle infection opportuniste. Dans l'analyse plus fine des taux moyens de ces cellules de l'immunité, nous avons observé des différences entre les deux groupes étudiés. Le taux de lymphocytes T (qui met plus de un an dans les deux groupes pour récupérer une valeur moyenne supérieure à 1000 cellules/ μ L) est influencé par la dose de SAL administrée. A J60, le taux de LT circulants est plus faible chez les receveurs traités avec du SAL à forte dose. Cette observation est probablement due à une plus forte déplétion T *in vivo* du greffon du fait d'un taux résiduel sérique plus élevé lors des 14 premiers jours post-greffe (seuil de 100 μ g/mL à atteindre pour obtenir une cytotoxicité dépendante du complément). Cette tendance s'inverse à J100, avec en moyenne des taux lymphocytaires T plus élevés chez les receveurs d'une dose de SAL de 90mg/kg : lymphocytes T conventionnels ($p=0,76$), notamment les LT8 de phénotypes mémoires, mais aussi les NKT ($p=0,35$). Cette reconstitution lymphocytaire T accrue serait cohérente avec une moindre incidence de la GVH aiguë et donc un moindre recours aux immunosuppresseurs. Cependant l'incidence de la GVH aiguë est la même dans les deux groupes (en moyenne 58%, $p=0,85$). Toutes ces observations sont à interpréter avec prudence puisqu'aucune significativité statistique n'a été mise en évidence. Par contre, le taux de lymphocytes NK est plus élevé à J100 chez ces mêmes patients ayant reçu la forte dose de SAL ($p=0,03$). L'explication la plus probable de cette reconstitution accrue (LT+NK) serait une expansion périphérique en réponse à des pathogènes. En effet, ces taux plus élevés s'observent surtout pour les LT de phénotypes mémoires et activés. Or, le SAL est connu pour bloquer les molécules de co-stimulation des LT et il a été décrit comme diminuant le taux de LT HLA-DR circulants [124]. Donc ces LT s'expandent probablement par stimulation antigénique de pathogènes favorisés par la forte dose de SAL. En fait, c'est l'incidence des infections à EBV et à adénovirus qui est plus élevée dans ce groupe, avec une date de début d'infection en médiane de 67 jours et 48 jours respectivement.

A J180, le taux moyen de LT des patients ayant reçu 90mg/kg de SAL est à nouveau inférieur au taux moyen des LT des patients ayant reçu 40mg/kg de SAL ($p=0,03$). C'est à ce moment de la greffe que la thymopoïèse prend le relais de la reconstitution immunitaire. A plus de 6 mois de la greffe, le SAL n'est plus présent dans le sang. Il peut influencer, à ce moment, la RI par son effet anti-thymocytaire direct. Nous supposons, sans confirmation objective (étude des TREC non faite), que la thymopoïèse est plus ralentie par la forte dose de SAL. En effet, un des bons reflets de cette thymopoïèse est l'apparition d'un taux de LT4 notamment naïfs à un taux normal dans le sang circulant. Or, c'est cette sous-population dont le taux est le plus abaissé en moyenne ($p=0,01$). Le LT4 est la clé de voute des réponses anti-infectieuses, et son taux dans le

sang conditionne l'incidence des infections opportunistes notamment les infections virales. Ces infections virales plus fréquentes (EBV et adénovirus) dans le groupe ayant reçu 90mg/kg de SAL ne sont pas pour autant plus sévères. Elles connaissent dans plus de 80% des cas une évolution favorable (comme dans le groupe ayant reçu 40mg/kg de SAL).

A J360, les taux de LT (LT4 et LT8), LB, lymphocytes NK et NKT sont comparables dans les deux groupes. Remarquons que le taux moyen de LT4 naïfs est supérieur dans le groupe ayant reçu 90mg/kg de SAL. Cette observation est probablement due à une meilleure fonction thymocytaire par une moindre incidence de la GVHc sévère. De plus, la RI fonctionnelle semble aussi meilleure dans le groupe ayant reçu 90mg/kg de SAL. En effet, environ 2/3 de ces patients ont recouvré des TTL PHA, PMA et aspergillus positifs à J360 contre seulement 40% dans l'autre groupe. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,10$) ; on peut tout de même supposer qu'une forte dose de SAL (>60mg/kg) permet une reconstitution immunitaire fonctionnelle meilleure à un an de la greffe (par diminution de l'incidence de la GVH chronique sévère et donc un moindre recours thérapeutique à des immunosuppresseurs, et une moindre atteinte thymique par la maladie).

- En ce qui concerne l'immunité humorale, malheureusement, compte tenu d'une substitution systématique en immunoglobulines polyvalentes des receveurs de greffe non apparentée, le dosage des IgA, G, M n'a pas pu être exploité. La forte dose de SAL ne ralentit pas la cinétique de récupération du taux de LB circulants contrairement aux études précédentes [123]. Trois arguments convergent dans notre étude : la forte dose de SAL-Fresenius semble au contraire favoriser la reconstitution des LB à J360 (taux moyen supérieur, $p=0,09$) ; elle ne ralentit pas l'apparition du contingent le plus immature de phénotype CD19+ CD5+. Enfin, le groupe ayant reçu la plus forte dose de SAL n'a pas présenté plus d'infections bactériennes à germes encapsulés. En effet, nous le savons, le défaut de mémoire B entraîne un taux circulant d'immunoglobulines diminué avec une vulnérabilité du patient aux bactéries telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. Les patients peuvent obtenir cependant un titre protecteur d'anticorps vis-à-vis de ces pathogènes grâce à la vaccination. Cette réponse à la vaccination n'a pas pu être exploitée dans notre étude du fait d'un grand nombre de données manquantes.

Le taux circulant des cellules de l'immunité n'est bien sûr qu'un mauvais reflet de la déplétion *in vivo* dans les organes lymphoïdes et autres sites soumis aux effets du SAL. C'est pourquoi il est indispensable d'étudier l'impact clinique sur les infections et la GVH.

2/ Clinique

Selon la littérature, la dose de SAL dans le conditionnement, lorsqu'elle est élevée (plus de 60mg/kg), permet une meilleure prévention des conflits immunologiques hôte/greffon, mais permettrait une plus forte incidence d'infections opportunistes, plus ou moins sévères [118]. Par exemple, le SAL retarde la reconstitution des LT4 spécifiques du CMV. Or, l'infection à CMV (PCR dans le sang positive) constitue la principale cause de morbidité et de mortalité par infection après l'allogreffe de CSH. Son origine est exogène (greffon, produits sanguins) ou endogène (réactivation). L'incidence des infections à CMV dans notre étude est de 24,8% (30 patients sur 121). Ces infections débutent en moyenne 57,5 jours après la greffe [22-379jours]. La maladie à CMV (atteinte d'organe en plus d'une preuve biologique de réactivation du CMV) est détectée dans 5,7% des cas. Le CMV n'est jamais responsable de décès dans cette cohorte. Les antiviraux (en particulier le ganciclovir) sont toxiques, responsables d'une neutropénie qui favorise l'émergence d'infections bactériennes dans notre étude ($p=0,04$) et mycoses. Ainsi, 2 patients sur 7 traités pour une infection à CMV ont présenté une mycose soit 28,6% des patients (alors que 11% des patients en dehors d'une infection à CMV ont au moins une infection mycotique dans l'année post-greffe). La reconstitution de l'activité T auxiliaire CMV spécifique est reflétée par les TTL CMV. En effet, dans notre cohorte, 100 % des patients pour lesquels aucune activité proliférative spécifique du CMV à J60 n'est démontrée développent ce type d'infection entre J100 et J180, contre 0 % des patients quand cette activité est démontrée. Cependant, la reconstitution des LT fonctionnels vis-à-vis du CMV est très lente :quelque soit la dose de SAL administrée. L'incidence de la maladie à CMV reste rare dans notre échantillon et équivalente dans les deux groupes comparés (5/69 patients du groupe SAL 40 versus 4/52 patients du groupe SAL 90). La forte dose de SAL ne semble pas modifier l'incidence du CMV dans notre étude, mais compte tenu d'un nombre insuffisant de patients ayant recouvré une activité T vis-à-vis du CMV, nous devons interpréter ces résultats avec prudence.

L'infection à EBV (détection d'une ADNémie EBV par technique PCR) compliquée d'un lymphome du transplanté (PTLD) est aussi particulièrement à risque chez les patients recevant du SAL. Les facteurs de risque couramment décrits d'un PTLD sont [133] : la T déplétion *ex vivo* ou *in vivo* [134], la GVH aiguë sévère et au moins deux incompatibilités HLA entre donneur et receveur [135]. D'autres facteurs de risque ont été discuté comme l'âge du receveur supérieur à 50 ans, une deuxième allogreffe de CSH [66] et un taux élevé de CD34 injecté ($>1.35.10^6/kg$) [136]. L'incidence du PTLD passé de 1,1% à 3,6 ou 8% en présence de 1, 2 ou 3 facteurs de risque [66]. Le seul facteur de risque à 1 an est la GVHc extensive. Dans notre

étude nous avons mis en évidence un effet dose du SAL administré. La dose de SAL à 90mg/kg favorise l'apparition d'une ADNémie EBV positive chez les patients avant J180 sans accroître l'incidence des PTLD. L'incidence des infections graves à EBV (lymphome du transplanté) est très rare et reste équivalente dans les 2 groupes (2/69 patients dans le groupe SAL 40 et 1/52 patients dans le groupe SAL 90).

D'autre part, les infections à adénovirus sont décrites dans notre échantillon chez 25,5 % des enfants et 15,7 % des adultes. Les facteurs de risque reconnus d'incidence accrue d'infection à adénovirus ont été mis en évidence dans notre échantillon : la population pédiatrique, la survenue d'une GVH aiguë sévère et d'une GVH chronique extensive. Nous notons que l'administration d'une forte dose de SAL augmente l'incidence de l'infection à adénovirus sans sévérité. L'évolution de l'infection à adénovirus n'est défavorable que très rarement dans notre échantillon. De façon équivalente dans les 2 groupes étudiés : 1/69 patients connaît une évolution défavorable dans le groupe SAL 40 et 1/52 dans le groupe SAL 90.

Au total, une plus forte dose de SAL lors du conditionnement du receveur favorise la survenue d'infections virales à adénovirus et EBV et non à CMV. Cependant, l'incidence des infections virales et la morbi-mortalité qui en découle sont identiques quelque soit la dose de SAL utilisé dans le conditionnement. Nous pouvons dire que la forte dose de SAL favorise l'incidence des infections virales non graves, du fait d'une plus forte déplétion LT4. La bonne stratégie pré-emptive, et les traitements anti-viraux permettent de juguler ces infections. Ainsi, la forte dose de SAL n'augmente pas la mortalité par infections.

B. Les conflits immunologiques entre donneur et receveur

1/ Le rejet de greffe

Le risque de rejet est très faible dans les circonstances habituelles de greffe (de 1 à 2% selon les études) en raison de l'immunosuppression induite chez le receveur par le conditionnement. Dans notre étude 5 patients ont rejeté leur greffon (soit 4,1%), dont 3 d'entre eux greffés pour syndrome myélodysplasique. Parmi eux, 4 patients avaient reçu du SAL à 40mg/kg lors du conditionnement et 1 seul patient avait reçu la dose de 90mg/kg. Malheureusement, aux vues de ce faible effectif, nous ne pouvons tirer aucune conclusion sur l'impact de la dose de SAL Fresenius sur l'incidence du rejet de greffe.

2/ La maladie du greffon contre l'hôte

La GVH survient dans près de 30% des cas après une allogreffe familiale géno-identique et peut atteindre plus de 80% des cas après une allogreffe phéno-identique. Dans notre étude environ 58% de notre population greffée en phéno-identique ont présenté une GVHa et 67% une GVHc. Selon notre étude, la dose administrée minimale de SAL à 40mg/kg suffirait à prévenir l'incidence de la GVH aiguë sévère (II-IV) aussi bien qu'une forte dose de 90mg/kg : 58% des patients ayant reçu SAL40 et 59,6% des patients ayant reçu SAL 90 sont atteints de GVH aiguë sévère ($p=0,85$). De même, la dose de SAL n'influence pas l'incidence globale de la GVHc. Par contre, elle influence l'incidence de la GVHc sévère selon les critères NIH: 29,2% des patients sont atteints de GVHc sévère lorsque le conditionnement contenait du SAL à la dose de 90mg/kg contre 62,9% des patients ayant bénéficié de SAL à 40mg/kg ($p=0,01$). Le SAL à forte dose permet donc de diminuer de moitié l'incidence de la GVH chronique sévère, sans accroître le taux d'infections mortelles. Il permettrait donc, à long terme une bien meilleure qualité de vie des patients comme l'a montré l'étude de Bacigalupo avec un recul de plus de 4ans [108] (*performans status* supérieur, arrêt des immunosuppresseurs plus rapide, TRM meilleure).

3/ La rechute

Même si la rechute touche un peu plus de patients dans le groupe ayant reçu du SAL à forte dose (17,4% chez les patients ayant reçu la dose de 40mg/kg versus 23,1% chez les patients ayant reçu la dose de 90 mg/kg ($p=0,44$)), il semble que l'effet GVL soit préservé. Pourtant la dose de SAL influence la récupération d'un taux circulant de lymphocytes NK, LT4 et LT8, 3 sous-types connus comme support de la GVL. En effet, un essai [137] a utilisé des transfusions de lymphocytes du donneur déplétées en LT8 afin de réduire l'incidence des maladies du greffon contre l'hôte. Cet essai montre que les LT4, plus ou moins associés aux lymphocytes NK, sont capables d'exercer un effet anti-leucémique patent sans déclencher de maladie du greffon contre l'hôte grave. Dans notre étude, si le taux de lymphocytes NK est plus élevé à J100 dans le groupe recevant une forte dose de SAL, un taux de lymphocytes T4 est sensiblement inférieur pendant toute l'année suivant la greffe dans ce même groupe, et un taux de LT8 est aussi plus bas à J180.

Au total, la dose de SAL administrée aux patients lors du conditionnement n'influence aucun des critères de jugement clinique testés :

- Incidence des infections post-greffes
- Incidence de la GVHa sévère et la GVHc extensive,
- Incidence de la rechute

La forte dose de SAL diminue par contre l'incidence de la GVH chronique sévère au bénéfice d'une reconstitution immunitaire fonctionnelle meilleure et une meilleure qualité de vie. A la question : Pourquoi la diminution de moitié de l'incidence de la GVHc sévère n'influence pas la survie globale ou par la survie par non toxicité du traitement à 2 ans? Nous pouvons proposer deux explications :

- la GVH chronique sévère n'augmente pas la mortalité car elle véhicule l'effet GVL et donc diminue le taux de rechute [138]. Mais dans cette étude, le taux de rechute est équivalent dans les deux groupes comparés.
- la seconde explication semble la plus probable ; la GVHc sévère impacte sur la survie seulement après plusieurs années de recul. L'étude de Bacigalupo [107] a confirmé l'effet positif du sérum anti-lymphocytaire forte dose sur la réduction d'incidence de la GVHc extensive et après 4 ans de recul une meilleure qualité de vie (*performans status* supérieur et moindre recours aux immunosuppresseurs). L'impact sur la survie de la moindre GVHc sévère nécessite très probablement un recul de plus de 10 ans [139].

CONCLUSION

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ne cesse d'accroître ses indications, or seulement 30% des patients greffés pourront bénéficier d'une greffe HLA compatible apparentée. Un nombre croissant d'allogreffes réalisées en conditions non apparentées pose le problème de la principale limite de cette thérapeutique : l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) grevée d'une morbi-mortalité élevée. Il a été clairement démontré ces 20 dernières années l'intérêt dans ce type de greffe de l'administration de sérum anti-lymphocytaire (SAL) en prophylaxie (lors du conditionnement du receveur) pour diminuer l'incidence et la sévérité de la GVH. La tendance est actuellement de diminuer les doses administrées de SAL avec pour le SAL de type thymoglobulines une dose de 7,5mg/kg admise. Malheureusement, très peu d'études ont considéré le SAL-fresenius, et encore moins les conséquences sur la reconstitution immunitaire du receveur en fonction de la dose administrée. Nous avons, dans cette étude rétrospective, comparé 2 doses de SAL-Fresenius administré à 121 patients allogreffés de CSH issues de donneurs non apparentés : à la dose de 40mg/kg (n=69) ou à une dose de 90mg/kg (n=52). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes en termes de mortalité par toxicité (TRM), survie sans rechute (DFS) ou survie globale (OS). De façon surprenante, l'incidence de la GVH était très peu modifiée par l'administration d'une forte dose de SAL (seule l'incidence de la GVHc sévère est plus élevée dans le groupe SAL-40). La RI est globalement similaire dans les deux groupes :

- le taux des lymphocytes circulants est peu modifié. Les NK, semblent, en moyenne, augmentés à J100 dans le groupe SAL-90. A J180, les patients du groupe SAL-90 ont un taux de LT plus bas (LT8, LT4 et NKT). Ces perturbations de la reconstitution immunitaire sont corrélées à une plus grande incidence des infections à EBV et adénovirus (notamment le déficit des LT4, cellules centrales dans la réponse anti-infectieuse). Finalement, à J360 tous les taux circulants lymphocytaires sont équivalents dans les deux groupes.
- sur le plan fonctionnalité, selon les tests de transformation lymphoblastique (TTL), pour un taux équivalent de lymphocytes circulants à J360 dans les deux groupes, une plus forte proportion de patients dans le groupe SAL 90 a récupéré une activité.

Au total, nous retenons donc que la dose de 40mg/kg est à envisager comme suffisante pour prévenir la GVH aiguë sévère. La dose de 90mg/kg sans engendrer de répercussion majeure

clinico-biologique sur la RI permettrait de réduire de moitié l'incidence de la GVH chronique sévère et donc d'améliorer la qualité de vie des patients.

BIBLIOGRAPHIE

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **2006** Apr 27;354(17):1813-26.
2. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* **2001** May 17;411(6835):385-9.
3. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* **2007**;25:139-70.
4. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **1990** Feb 1;75(3):555-62.
5. Dickinson AM, Wang XN, Sviland L, et al. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nat Med* **2002** Apr;8(4):410-4.
6. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **1999** Aug 15;94(4):1201-8.
7. Alyea EP, Soiffer RJ, Canning C, et al. Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* **1998** May 15;91(10):3671-80.
8. Lisbonne M, Leite-de-Moraes MC. Invariant Valpha14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur Cytokine Netw* **2003** Jan-Mar;14(1):4-14.
9. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* **2005**;23:877-900.
10. Leite-De-Moraes MC, Moreau G, Arnould A, et al. IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur J Immunol* **1998** May;28(5):1507-15.
11. Leite-de-Moraes MC, Lisbonne M, Arnould A, et al. Ligand-activated natural killer T lymphocytes promptly produce IL-3 and GM-CSF in vivo: relevance to peripheral myeloid recruitment. *Eur J Immunol* **2002** Jul;32(7):1897-904.
12. Lisbonne M, Hachem P, Tonanny MB, et al. In vivo activation of invariant V alpha 14 natural killer T cells by alpha-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity. *Eur J Immunol* **2004** May;34(5):1381-8.
13. Morris ES, MacDonald KP, Rowe V, et al. NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs. *J Clin Invest* **2005** Nov;115(11):3093-103.
14. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **2000** Jul 6;343(1):37-49.
15. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **2002** Mar 15;295(5562):2097-100.
16. Kolb HJ, Guenther W, Gyurkocza B, et al. Tolerance and chimerism. *Transplantation* **2003** May 15;75(9 Suppl):26S-31S.
17. Kolb HJ, Simoes B, Schmid C. Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* **2004** Mar;16(2):167-73.

18. Xia G, Truitt RL, Johnson BD. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen-presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras. *Biol Blood Marrow Transplant* **2006** Apr;12(4):397-407.
19. Barrett AJ. Mechanisms of the graft-versus-leukemia reaction. *Stem Cells* **1997**;15(4):248-58.
20. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* **1990** Oct 15;76(8):1464-72.
21. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* **2005** Dec;11(12):945-56.
22. Vogelsang GB, Arai S. Mycophenolate mofetil for the prevention and treatment of graft-versus-host disease following stem cell transplantation: preliminary findings. *Bone Marrow Transplant* **2001** Jun;27(12):1255-62.
23. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* **2007** May;7(5):340-52.
24. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* **1997** Oct 15;90(8):3204-13.
25. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood* **2007** Oct 1;110(7):2235-41.
26. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* **1995** Jun 9;268(5216):1476-80.
27. Erlich HA, Opelz G, Hansen J. HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* **2001** Apr;14(4):347-56.
28. Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **2001** Aug 15;19(16):3685-91.
29. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* **2004** Nov 25;351(22):2265-75.
30. Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* **2007** Oct;150(4):197-214.
31. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* **2007** Nov 15;110(10):3804-13.
32. Daikeler T, Tyndall A. Autoimmunity following haematopoietic stem-cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* **2007** Jun;20(2):349-60.
33. Zhang C, Todorov I, Zhang Z, et al. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* **2006** Apr 1;107(7):2993-3001.
34. Weiden PL, Flournoy N, Sanders JE, Sullivan KM, Thomas ED. Antileukemic effect of graft-versus-host disease contributes to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *Transplant Proc* **1981** Mar;13(1 Pt 1):248-51.
35. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* **2003**;54:29-52.

36. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* **2006** Jan;12(1):31-47.
37. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **1974** Oct;18(4):295-304.
38. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* **1980** Aug;69(2):204-17.
39. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am* **2011** Feb;25(1):101-16.
40. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* **2010** May 13;115(19):3861-8.
41. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, et al. Controlled trial of filgrastim for acceleration of neutrophil recovery after allogeneic blood stem cell transplantation from human leukocyte antigen-matched related donors. *Blood* **2001** Jun 1;97(11):3405-10.
42. Mohty M. [Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]. *Rev Prat* **2008** Dec 15;58(19):2111-22.
43. Peggs KS. Reconstitution of adaptive and innate immunity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Cytotherapy* **2006**;8(5):427-36.
44. Dulphy N, Haas P, Busson M, et al. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* **2008** Aug 1;181(3):2227-37.
45. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* **2003** May 1;101(9):3730-40.
46. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* **1999** Jan 15;93(2):728-36.
47. Peggs KS, Mackinnon S. Immune reconstitution following haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* **2004** Feb;124(4):407-20.
48. Avigan D, Pirofski LA, Lazarus HM. Vaccination against infectious disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2001**;7(3):171-83.
49. Malfuson JV, Hicheri Y, Bonin P, et al. [ABO incompatibility and non myeloablative allogeneic stem cell transplantation]. *Transfus Clin Biol* **2007** Aug;14(3):327-33.
50. Malfuson JV, Amor RB, Bonin P, et al. Impact of nonmyeloablative conditioning regimens on the occurrence of pure red cell aplasia after ABO-incompatible allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Vox Sang* **2007** Jan;92(1):85-9.
51. Ratanatharathorn V, Ayash L, Reynolds C, et al. Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biol Blood Marrow Transplant* **2003** Aug;9(8):505-11.
52. Storek J, Dawson MA, Maloney DG. Correlation between the numbers of naive T cells infused with blood stem cell allografts and the counts of naive T cells after transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2003** Dec;9(12):781-4.

53. Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, et al. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood* **2001** Aug 15;98(4):1116-21.
54. Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood* **2002** Sep 15;100(6):2235-42.
55. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* **2006** Aug 15;108(4):1291-7.
56. Gaidot A, Landau DA, Martin GH, et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplant co-administered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood* **2010** Dec 30.
57. Lowsky R, Takahashi T, Liu YP, et al. Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **2005** Sep 29;353(13):1321-31.
58. Storek J, Joseph A, Espino G, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* **2001** Dec 15;98(13):3505-12.
59. Morris ES, MacDonald KP, Hill GR. Stem cell mobilization with G-CSF analogs: a rational approach to separate GVHD and GVL? *Blood* **2006** May 1;107(9):3430-5.
60. Baron F, Schaaf-Lafontaine N, Humblet-Baron S, et al. T-cell reconstitution after unmanipulated, CD8-depleted or CD34-selected nonmyeloablative peripheral blood stem-cell transplantation. *Transplantation* **2003** Dec 27;76(12):1705-13.
61. Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* **2002** Feb 1;99(3):1071-8.
62. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* **2002** Jun 15;99(12):4357-63.
63. Baron F, Baker JE, Storb R, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* **2004** Oct 15;104(8):2254-62.
64. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* **2007** Oct;19(5):318-30.
65. Patah PA, Parmar S, McMannis J, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* **2007** Aug;40(4):365-8.
66. Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **2009** May 14;113(20):4992-5001.
67. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, et al. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* **2008** Aug;42(3):181-6.
68. Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* **2010** May;91(4):588-95.
69. Alangaden GJ, Wahiduzzaman M, Chandrasekar PH. Aspergillosis: The most common community-acquired pneumonia with gram-negative Bacilli as copathogens in stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease. *Clin Infect Dis* **2002** Sep 15;35(6):659-64.

70. Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol* **1997** Feb;54(2):131-8.
71. Chung B, Barbara-Burnham L, Barsky L, Weinberg K. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* **2001** Sep 1;98(5):1601-6.
72. Sportes C, Hakim FT, Memon SA, et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* **2008** Jul 7;205(7):1701-14.
73. Wils EJ, Cornelissen JJ. Thymopoiesis following allogeneic stem cell transplantation: new possibilities for improvement. *Blood Rev* **2005** Mar;19(2):89-98.
74. Krenger W, Hollander GA. The immunopathology of thymic GVHD. *Semin Immunopathol* **2008** Dec;30(4):439-56.
75. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* **2000** May 27;355(9218):1875-81.
76. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* **2000** Nov;1(5):426-32.
77. Solomon SR, Mielke S, Savani BN, et al. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* **2005** Aug 1;106(3):1123-9.
78. Peggs KS. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* **2004** Jun;45(6):1093-101.
79. Chen X, Barfield R, Benaim E, et al. Prediction of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Blood* **2005** Jan 15;105(2):886-93.
80. O'Keefe CL, Risitano AM, Maciejewski JP. Clinical implications of T cell receptor repertoire analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology* **2004** Jun;9(3):189-98.
81. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **2004** Dec 1;104(12):3647-54.
82. O'Keefe C L, Sobecks RM, Wlodarski M, et al. Molecular TCR diagnostics can be used to identify shared clonotypes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* **2004** Oct;32(10):1010-22.
83. Gratwohl A, Hermans J, Apperley J, et al. Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **1995** Jul 15;86(2):813-8.
84. Lee SJ, Vogelsang G, Gilman A, et al. A survey of diagnosis, management, and grading of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* **2002**;8(1):32-9.
85. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* **1994** Mar 15;57(5):685-94.
86. Souillet G, Rey S, Bertrand Y, et al. Outcome of unrelated bone marrow donor searches in 174 children resulting in 45 patients transplanted in the HLA-matched and -mismatched situation. *Bone Marrow Transplant* **2000** Jul;26(1):31-43.

87. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* **1996** May;15(5):435-42.
88. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* **1991** Mar;51(3):669-73.
89. Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N. Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* **2005** Feb 15;79(3):369-71.
90. Zand MS, Vo T, Huggins J, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* **2005** Jun 15;79(11):1507-15.
91. Ayuk FA, Fang L, Fehse B, Zander AR, Kroger N. Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. *Exp Hematol* **2005** Dec;33(12):1531-6.
92. Grulich C, Ziegler C, Finke J. Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant. *Biol Blood Marrow Transplant* **2009** Feb;15(2):173-82.
93. Eiermann TH, Lambrecht P, Zander AR. Monitoring anti-thymocyte globulin (ATG) in bone marrow recipients. *Bone Marrow Transplant* **1999** Apr;23(8):779-81.
94. Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica* **2005** Jul;90(7):931-8.
95. Monti P, Allavena P, Di Carlo V, Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* **2003** Feb;3(2):189-96.
96. Ayuk F, Perez-Simon JA, Shimoni A, et al. Clinical impact of human Jurkat T-cell-line-derived antithymocyte globulin in multiple myeloma patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* **2008** Sep;93(9):1343-50.
97. Ayuk F, Zander A, Kroger N. Antitumor effects of polyclonal antithymocyte globulins: focus on B-cell malignancies and multiple myeloma. *Ann Hematol* **2009** May;88(5):401-4.
98. Bunn D, Lea CK, Bevan DJ, Higgins RM, Hendry BM. The pharmacokinetics of anti-thymocyte globulin (ATG) following intravenous infusion in man. *Clin Nephrol* **1996** Jan;45(1):29-32.
99. Waller EK, Langston AA, Lonial S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2003** Jul;9(7):460-71.
100. Storb R, Weiden PL, Sullivan KM, et al. Second marrow transplants in patients with aplastic anemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamide and antithymocyte globulin. *Blood* **1987** Jul;70(1):116-21.
101. Storb R, Etzioni R, Anasetti C, et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood* **1994** Aug 1;84(3):941-9.
102. Weiden PL, Doney K, Storb R, Thomas ED. Antihuman thymocyte globulin for prophylaxis of graft-versus-host disease. A randomized trial in patients with leukemia treated with HLA-identical sibling marrow grafts. *Transplantation* **1979** Apr;27(4):227-30.

103. Remberger M, Aschan J, Barkholt L, Tollemar J, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin. *Clin Transplant* **2001** Jun;15(3):147-53.
104. Ramsay NK, Kersey JH, Robison LL, et al. A randomized study of the prevention of acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **1982** Feb 18;306(7):392-7.
105. Schetelig J, Bornhauser M, Kiehl M, et al. Reduced-intensity conditioning with busulfan and fludarabine with or without antithymocyte globulin in HLA-identical sibling transplantation--a retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant* **2004** Mar;33(5):483-90.
106. Bacigalupo A, Lamparelli T, Bruzzi P, et al. Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). *Blood* **2001** Nov 15;98(10):2942-7.
107. Bacigalupo A, Lamparelli T, Gualandi F, et al. Prophylactic antithymocyte globulin reduces the risk of chronic graft-versus-host disease in alternative-donor bone marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* **2002**;8(12):656-61.
108. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, et al. 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* **2006** May;12(5):560-5.
109. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, et al. 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* **2009** Sep;10(9):855-64.
110. Remberger M, Storer B, Ringden O, Anasetti C. Association between pretransplant Thymoglobulin and reduced non-relapse mortality rate after marrow transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* **2002** Mar;29(5):391-7.
111. Kroger N, Zabelina T, Kruger W, et al. In vivo T cell depletion with pretransplant anti-thymocyte globulin reduces graft-versus-host disease without increasing relapse in good risk myeloid leukemia patients after stem cell transplantation from matched related donors. *Bone Marrow Transplant* **2002** Apr;29(8):683-9.
112. Duggan P, Booth K, Chaudhry A, et al. Unrelated donor BMT recipients given pretransplant low-dose antithymocyte globulin have outcomes equivalent to matched sibling BMT: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* **2002** Nov;30(10):681-6.
113. Deeg HJ, Storer BE, Boeckh M, et al. Reduced incidence of acute and chronic graft-versus-host disease with the addition of thymoglobulin to a targeted busulfan/cyclophosphamide regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* **2006** May;12(5):573-84.
114. Finke J, Schmoor C, Lang H, Potthoff K, Bertz H. Matched and mismatched allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors using combined graft-versus-host disease prophylaxis including rabbit anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Oncol* **2003** Feb 1;21(3):506-13.
115. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, et al. Anti-thymocyte globulin overcomes the negative impact of HLA mismatching in transplantation from unrelated donors. *Exp Hematol* **2008** Aug;36(8):1047-54.
116. Kroger N, Zabelina T, Binder T, et al. HLA-mismatched unrelated donors as an alternative graft source for allogeneic stem cell transplantation after antithymocyte globulin-containing conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* **2009** Apr;15(4):454-62.

117. Meijer E, Cornelissen JJ, Lowenberg B, Verdonck LF. Antithymocyteglobulin as prophylaxis of graft failure and graft-versus-host disease in recipients of partially T-cell-depleted grafts from matched unrelated donors: a dose-finding study. *Exp Hematol* **2003** Nov;31(11):1026-30.
118. Ayuk F, Diyachenko G, Zabelina T, et al. Comparison of two doses of antithymocyte globulin in patients undergoing matched unrelated donor allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2008** Aug;14(8):913-9.
119. Schleuning M, Gunther W, Tischer J, Ledderose G, Kolb HJ. Dose-dependent effects of in vivo antithymocyte globulin during conditioning for allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors in patients with chronic phase CML. *Bone Marrow Transplant* **2003** Aug;32(3):243-50.
120. Aversa F, Terenzi A, Felicini R, et al. Mismatched T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* **1998** Dec;22 Suppl 5:S29-32.
121. Meijer E, Bloem AC, Dekker AW, Verdonck LF. Effect of antithymocyte globulin on quantitative immune recovery and graft-versus-host disease after partially T-cell-depleted bone marrow transplantation: a comparison between recipients of matched related and matched unrelated donor grafts. *Transplantation* **2003** Jun 15;75(11):1910-3.
122. Saito T, Kanda Y, Nakai K, et al. Immune reconstitution following reduced-intensity transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin: serial comparison with conventional myeloablative transplantation. *Bone Marrow Transplant* **2003** Sep;32(6):601-8.
123. Duval M, Pedron B, Rohrlich P, et al. Immune reconstitution after haematopoietic transplantation with two different doses of pre-graft antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* **2002** Oct;30(7):421-6.
124. Fehse N, Fehse B, Kroger N, et al. Influence of anti-thymocyte globulin as part of the conditioning regimen on immune reconstitution following matched related bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* **2003** Apr;12(2):237-42.
125. Nakai K, Kanda Y, Mineishi S, et al. Suspected delayed immune recovery against cytomegalovirus after reduced-intensity stem cell transplantation using anti-thymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* **2002** Feb;29(3):237-41.
126. Pistillo MP, Tazzari PL, Bonifazi F, et al. Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* **2002** Apr 27;73(8):1295-302.
127. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med* **1980** Sep 4;303(10):565-7.
128. Hows J, Bradley BA, Gore S, Downie T, Howard M, Gluckman E. Prospective evaluation of unrelated donor bone marrow transplantation. The International Marrow Unrelated Search and Transplant (IMUST) Study. *Bone Marrow Transplant* **1993** Oct;12(4):371-80.
129. Nademanee A, Schmidt GM, Parker P, et al. The outcome of matched unrelated donor bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies using molecular typing for donor selection and graft-versus-host disease prophylaxis regimen of cyclosporine, methotrexate, and prednisone. *Blood* **1995** Aug 1;86(3):1228-34.
130. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* **2005** Feb;35(3):225-31.
131. Zander AR, Zabelina T, Kroger N, et al. Use of a five-agent GVHD prevention regimen in recipients of unrelated donor marrow. *Bone Marrow Transplant* **1999** May;23(9):889-93.

132. Meijer E, Dekker AW, Verdonck LF. Influence of antithymocyte globulin dose on outcome in cytomegalovirus-seropositive recipients of partially T cell-depleted stem cell grafts from matched-unrelated donors. *Br J Haematol* **2003** May;121(3):473-6.
133. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* **1999** Oct 1;94(7):2208-16.
134. Hale G, Waldmann H. Risks of developing Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorders after T-cell-depleted marrow transplants. *CAMPATH Users. Blood* **1998** Apr 15;91(8):3079-83.
135. Gerritsen EJ, Stam ED, Hermans J, et al. Risk factors for developing EBV-related B cell lymphoproliferative disorders (BLPD) after non-HLA-identical BMT in children. *Bone Marrow Transplant* **1996** Aug;18(2):377-82.
136. van Esser JW, Niesters HG, van der Holt B, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **2002** Jun 15;99(12):4364-9.
137. Giralt S, Hester J, Huh Y, et al. CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **1995** Dec 1;86(11):4337-43.
138. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* **1981** Jun 18;304(25):1529-33.
139. Goerner M, Gooley T, Flowers ME, et al. Morbidity and mortality of chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings for patients with aplastic or refractory anemias. *Biol Blood Marrow Transplant* **2002**;8(1):47-56.
140. Immunobiology 7ème édition, Garland Science 2008.

ANNEXES

Annexe 1 : Classification de Glucksberg

Stades de sévérité des atteintes viscérales au cours de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte.

Stade	Peau	Foie	Intestin
1	Éruption maculo-papuleuse touchant moins de 25 % de la surface corporelle	Bilirubine 2-3 mg/dL (34-50 µmol/L)	Diarrhée > 500 mL/j ou nausée, anorexie ou vomissement avec confirmation d'une GVHD dans le tractus gastro- intestinal haut par biopsie
2	Éruption maculo-papuleuse touchant 25 à 50 % de la surface corporelle	Bilirubine 3,1-6 mg/dL (51-102 µmol/L)	Diarrhée > 1 000 mL/j et < 1 500 mL/j
3	Éruption maculo-papuleuse touchant plus de 50 % de la surface corporelle	Bilirubine 6,1-15 mg/dL (103-255 µmol/L)	Diarrhée > 1 500 mL/j
4	Érythrodermie généralisée avec formation de bulles et desquamation	Bilirubine > 15 mg/dL (> 255 µmol/L)	Diarrhée > 1 500 mL/j + douleurs abdominales +/- iléus

GVHD : *graft versus host disease*.

Grades de sévérité de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte.

Grade Glucksberg	Stade peau	Stade intestin	Stade foie	Karnofsky
I	1	0	0	
	2	0	0	
II	0-2	1	0-1	50-75
	0-2	0-1	1	
	3	1	0-1	
	3	0-1	1	
	3	0	0	
III	0-2	2	0-2	25-50
	0-2	0-2	2	
	3	0-3	2-3	
	3	2-3	0-3	
	0-3	0-3	4	
IV	0-3	4	0-4	0-25
	4	0-4	0-4	

Annexe 2. Classification de la GVH chronique limitée et extensive

Classification de la GVH chronique
GvHD limitée : 1 lésion décrite, avec une biopsie positive (cutanée ou labiale), sans autre manifestation de GVHc
lésions orales
dysfonctionnement hépatique modéré
plaques papulosquameuses (n<6), rash maculopapulaire ou lichénoïde <20% de la surface corporelle ou
dépigmentation <20% ou érythème <50% de la surface corporelle
sécheresse oculaire
lésions vaginales ou vulvaires
GvHD extensive : implication d'au moins 2 organes avec des signes de GVHc et une biopsie positive
scores de performance clinique <60%, perte de poids >15%, infections récurrentes en association avec
lésions cutanées supérieures à celles définies dans la GVHc limitée
sclérodermie
onycholyse ou onychodystrophie accompagnée d'une manifestation de GVHc repérée dans un organe
diminution de la motricité du poignet ou de la cheville
contractures
bronchiolite oblitérante
fasciite ou sérosite
biopsie gastro-intestinale positive
biopsie ou tests fonctionnels hépatiques positifs, en association avec une cGvHD repérée dans un organe

Annexe 3. Etudes rétrospectives sur l'intérêt de l'administration du SAL dans le conditionnement de l'allogreffe de CSH

Etude	Type étude	SAL	GVHa	GVHc	Rechute	Survie globale	TRM
1/ Patients appariés pour les facteurs de risque impactant sur la GVH et la survie							
Remberger [110] 2002	Prospectif Patients appariés sur leurs facteurs pronostics Greffes non apparentées	Thymoglobulines : 10mg/kg	↘	NS	↘	↗	NS
Schetelig [105] 2004	Retrospectif, géno-identique, conditionnement NMA	Fresenius : 40mg/kg	=	↘ (limitée)	=	=	=
Fehse [124] 2003	Retrospectif Grefe géno-identique	Fresenius 60 à 90mg/kg	↘	↘	↗	=	= car ↗infections
2/ Etude des allogreffes apparentées versus non apparentées							
Duggan [112] 2002	Retrospectif Non apparenté (SAL) et apparenté (sans SAL), tous HLA identique	Thymo 4,5mg/kg	=	=	=	=	=
Deeg [113] 2006	Non apparenté (SAL, HLA 8/8 ou 7/8) et apparenté (sans SAL, HLA identique)	Thymo 4,5mg/kg et 6mg/kg	=	=	=	=	=
3/ Etude des allogreffes non apparentées HLA-identiques versus HLA-différent							
Finke [114] 2003	Retrospectif Comparaison HLA identique 8/8 (pas de SAL) vs différent 6-7/8 (SAL)	Fresenius 60 à 90mg/kg	=	=	Dépend du niveau risque	Dépend du niveau risque	=
Ayuk [115] 2008	Retrospectif Comparaison HLA identique 8/8 (pas de SAL) vs différent 7/8 (SAL)	Fresenius 90mg/kg	=	=	=	=	=
Kröger [116] 2009	Typage par biologie moléculaire HLA 1, B, C, DRB1, DQB1 (10/10 versus 9/10 versus 6- 8/10)	Fresenius 90mg/kg	=	=	=	=	=

Annexe 4. Impact de la dose de SAL

Etude	Type étude	Type greffe	SAL comparés	Dose retenue	GVHa	GVHc	Rechute	Survie globale	TRM
Bacigalupo 2001	Prospectif Suivi médian : 2 ans	Non apparentée	Thymoglobulines 1/ 15mg/kg 2/ 7,5mg/kg 3/ 0mg/kg	15mg/kg	↘	↘	NS	↘ NS	↗
Bacigalupo 2002	Rétrospectif Suivi médian : 4 ans	Non apparentée	Thymoglobulines 1/ 15mg/kg 2/ 7,5mg/kg 3/ 0mg/kg	7,5mg/kg	↘	↘	=	↗	=
Schleunig 2003	Rétrospectif, recherche de la dose optimale de SAL, greffe pour LMC en phase chronique	Non apparentée	Fresenius de 20 à 120mg/kg	> 60mg/kg	↘	↘	↘	↗	=
Meijer 2003	Rétrospectif Comparaison doses, greffon partiellement T déplété	Non apparentée	Thymoglobulines 1/ 8mg/kg 2/ 6mg/kg 3/ 4mg/kg	6mg/kg	↘	↘	=	=	=
Mohty 2003	Rétrospectif Comparaison doses dans le conditionnement NMA pour greffes de haut risque	Apparentée	Thymoglobulines 1/ 2,5mg/kg 2/ 7,5mg/kg 3/ 10 mg/kg	>7,5mg/kg	↘	↘NS	↗	=	=
Ayuk 2008	Rétrospectif Greffe pour Hémopathie maligne	Non apparentée	Fresenius 1/ 60mg/kg 2/ 30mg/kg	30mg/kg	=	=	↘	↗	↘

Annexe 5. Caractéristiques des patients

Patients	descriptifs	nombre
Sexe	homme	80
	femme	41
Age	Enfant	51
	Adulte	70
Diagnostique	LAM	39
	LAL	29
	Aplasie médullaire	11
	Lymphomes	9
	Leucémie myéloïde chronique	8
	myélodysplasie	4
	LMMCJ	4
	Leucémie lymphoïde chronique	4
	Hémoglobinopathies	3
	Amégacaryocytose congénitale	2
	Sarcome d'Ewing	1
	Myélome	1
	Déficit immunitaire congénital	2
Autres	4	
Risque	élevé	73
	faible	48
Conditionnement	myéloablative	52
	non myéloablative	69
Dose de SAL frésénus	Forte dose 90mg/kg	52
	Faible dose 40mg/kg	69
Prophylaxie de la GVH	cyclosporine+MTX	58
	cyclosporine+cellcept	59
	cyclosporine+solumédrol	1
	Déplétion T ex vivo	1
	cyclosporine seule	1
Incompatibilité ABO	compatibilité	49
	Incompatibilité majeure	42
	Incompatibilité mineure	29
	Incompatibilité bidirectionnelle	1
Incompatibilité HLA	10/10	80
	9/10	38
	8/10	3
Origine du greffon	Moelle osseuse	73
	Cellules souches mobilisées	48
	Sang placentaire	0
Statut CMV (Donneur/Receveur)	D-/R-	20
	D+/R+	51
	D+/R-	24
	D-/R+	26
Richesse du greffon	Cellules nucléées (10^8 /kg)	5,06
	Cellules CD34 (10^6 /kg)	4,8
	LT (10^7 /kg)	13,7
	CFU-GM (10^4 /kg)	192,3
Sexe Donneur/receveur (D/R)	Homme/ homme	56
	Femme/ femme	16
	Homme / femme	25
	Femme/ homme	24

Annexe 6. Devenir post-greffe des patients

Devenir des patients	descriptifs	Nombre
Cancers secondaires	Lymphome EBV induit	4
	Carcinome pulmonaire	2
Rechute de la maladie	oui	24
	non	97
Rejet de greffe	oui	5
	non	116
Infections virales	CMV	30
	EBV	28
	adénovirus	24
	VRS	13
	HHV6	6
	HSV	6
	VZV	5
GVH aiguë	grade I	11
	grade II	59
	grade III	8
	grade IV	4
	no	39
GVH chronique	limitée	16
	extensive	44
	aucune	60
Décès	rechute	20
	Infections	6
	Pneumopathie interstitielle	6
	Déchéance multi viscérale	7
	GVH aiguë	3
	GVH chronique	3
	MVO	1
	Cancer secondaire	1
	Toxicité conditionnement	1
	autre	1

VU

NANCY, le **15 février 2011**
Le Président de Thèse

NANCY, le **2 mars 2011**
Le Doyen de la Faculté de Médecine
Par délégation,

Professeur P. BORDIGONI

Mme le Professeur M.C. BÉNE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/3467

NANCY, le **3 mars 2011**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur J.P. FINANCE

RESUME

Le sérum anti-lymphocytaire (SAL) administré lors du conditionnement pour une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) diminue l'incidence et la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë et chronique (GVHa et GVHc). La reconstitution immunitaire (RI) a été peu étudiée. Des études suggèrent une incidence plus élevée d'infections mortelles en cas de forte dose de SAL (> 60mg/kg). Nous avons, dans une étude rétrospective, comparé 2 doses de SAL-Fresenius administré à 121 patients allogreffés de CSH issues de donneurs non apparentés. Le SAL a été administré à la dose de 40mg/kg (n=69) ou à une dose de 90mg/kg (n=52). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les 2 groupes en termes de mortalité par toxicité, survie sans rechute ou survie globale. L'incidence de la GVHa sévère est strictement identique dans les 2 groupes (58%, p=0,85), par contre l'incidence d'une GVHc sévère est plus élevée dans le groupe SAL-40 (62,9% vs 29,2% p=0,01). Les taux circulants des lymphocytes, notamment les NK, semblent, en moyenne, augmentés à J100 dans le groupe SAL-90 (344,21/ μ l vs 235,26/ μ l, p=0,03). A J180, ces patients ont une RI plus lente (LT : 411,32/ μ l vs 692,18/ μ l, p=0,03 dont LT4 naïfs 5,35/ μ l vs 28,27/ μ l, p=0,01, LT8 et NKT, p=0,08). Ceci est corrélé à une plus grande incidence des infections non graves à EBV (32,7% vs 15,7% des patients, p=0,04) et adénovirus (26,9% vs 14,5%, p=0,03). La RI fonctionnelle selon les tests de transformation lymphoblastique (TTL) est discrètement augmentée dans le groupe SAL-90 (NS). Finalement, la dose de 90mg/kg semble recommandée pour améliorer la qualité de vie des patients, sans accroître la TRM par infections opportunistes ; mais une étude prospective est nécessaire pour confirmer ces résultats.

TITRE EN ANGLAIS: COMPARISON OF TWO DOSES OF ANTITHYMOCYTE GLOBULIN IN PATIENTS UNDERGOING UNRELATED DONOR ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Médecine Spécialisée - Année 2011

Mots clés: SAL- Dose- Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques- reconstitution immunitaire

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

**UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY1
Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY cedex**