



**HAL**  
open science

# Reconstitution des sous-populations lymphocytaires chez le patient en suite d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Etude rétrospective de 60 patients.

Marc Muller

► **To cite this version:**

Marc Muller. Reconstitution des sous-populations lymphocytaires chez le patient en suite d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Etude rétrospective de 60 patients.. Sciences pharmaceutiques. 2009. hal-01739130

**HAL Id: hal-01739130**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739130v1>**

Submitted on 20 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**FACULTE DE PHARMACIE**

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 28 Octobre 2009 à 17h

Par **MULLER Marc**  
né (e) le 12.04.1981

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Reconstitution des sous-populations lymphocytaires chez le**  
**patient en suite d'allogreffe de cellules souches**  
**hématopoïétiques.**  
**Etude rétrospective de 60 patients**

---

Membres du Jury

Président : Mme Chantal FINANCE, Professeur des Universités – Praticien attaché, CHU Nancy

Juges : M. Thomas LECOMPTE, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU Nancy

M. Ali DALLOUL, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU Nancy

M Sylvain SALIGNAC, Praticien Hospitalier, CHU Nancy

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2009-2010**

**DOYEN**

Chantal FINANCE

**Vice-Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :  
Pharmaceutique Hospitalier**

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Gérald CATAU

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France Pochon

Anne ROVEL

Maria Wellman-Rousseau

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE.....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU.....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE.....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN .....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### MAITRES DE CONFÉRENCES

Monique ALBERT .....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND.....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA .....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN .....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB .....	Parasitologie, Mycologie
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE .....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY .....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie
Adel FAIZ .....	Biophysique-accoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique

**FACULTE DE PHARMACIE****PRESENTATION**

Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER.....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN .....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....

Sémiologie
------------

**PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD .....

Anglais
---------

**ASSISTANT**

Annie PAVIS .....

Bactériologie
---------------

**Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois  
(Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET .....

Directeur
-----------

## REMERCIEMENTS

*Je voudrais pouvoir avant tout remercier mon jury, d'être présent ici en ce lieu pour me juger, m'évaluer et c'est un grand honneur que vous m'accordez.*

*Madame le Professeur FINANCE, vous m'honorez d'accepter la présidence de ce jury. Par votre enseignement, vous m'avez incité à me joindre à la famille de la biologie et de l'hôpital. Par ce travail, je vous témoigne ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Monsieur le Professeur LECOMPTE, vous avez été mon tuteur et mon mentor pendant ces deux dernières années. Votre sollicitude au cours de ces années m'a énormément touché et l'attention que vous portez aux internes de biologie ne saurait être assez remerciée. J'ai appris avec vous, l'hématologie est devenue une passion. Je ne peux que vous remercier de cet élan en continuant à évoluer dans ce domaine. Par votre présence vous m'honorez et vous témoigne par ce travail mon profond respect*

*Monsieur le Professeur DALLOUL, vous m'avez ouvert votre puit de sciences et j'y ai plongé. Merci pour toutes les remarques apportées à ce travail, la pertinence de vos remarques restera bien ancrée dans ma mémoire. Vous m'avez ouvert un monde de technologies appliquées, à mon tour de les maîtriser. Par votre présence vous m'honorez et vous témoigne par ce travail mon profond respect*

*Monsieur le Docteur SALIGNAC, vous avez toujours su nous montrer les petits détails intéressants de notre métier. Vous avez toujours rendu les stages sympathiques, attractifs et interactifs. J'ai passé de bons moments au laboratoire avec vous et l'équipe de cytologie. J'espère encore en passer de meilleurs...Par ce travail, je vous témoigne de ma plus grande gratitude et de mon profond respect.*

*Parmi ces quatre dernières années, je ne saurais oublier de remercier l'équipe du service d'hématologie biologique et notamment l'équipe de cytologie à laquelle je dois beaucoup.*

*Je tiens aussi à remercier le Dr BRAUN : Françoise, tu m'as initié à l'hématologie pratique et je ne serais probablement pas ici si tu n'avais pas été là. Je te remercie profondément.*

*A toutes les équipes qui m'ont toujours gentiment accueilli*

*Au Pr STOLTZ, Dr BENSOUSSAN et Dr DECOT, merci de m'avoir accueilli et soutenu dans mon dernier stage.*



*A Laetitia,*

*Tu as toujours été de tout cœur avec moi de Thionville à Nancy, du concours de première année à la fin de mes études. Tu as su gagner mon cœur et à travers tous ces moments, je n'en suis que plus heureux. Mon père a raison, je ne serais pas ici si tu n'avais pas été là.*

*A Gaston, Martine*

*L'ancêtre, merci de m'avoir toujours encouragé dans mon travail. Nous n'avons toujours pas retrouvé la grande ourse mais viendra le temps où nous y arriverons (tout comme te faire appelé papapi par tes petites filles)*

*Martine, une rencontre tardive mais agréable et plein de bonnes surprises.*

*A Maman,*

*Tu nous as quittés bien trop tôt, mais tu as toujours été présente dans mon cœur.*

*A Philippe, Célia, Violette et Mélusine*

*Nous ne nous voyons guère mais nous sommes dans nos cœurs respectifs. Pas besoin de mots pour décrire mon affection à votre égard et l'amour que j'ai pour mes 2 merveilleuses nièces.*

*A Bruno, Sylvie, Lionel (et la presque belle famille)*

*Vous avez eu la patience de nous supporter pendant nos années d'études. Enfin libérés, les poussins sont tous casés. Merci pour votre soutien.*

*A Michaël, binôme de toujours, Mr G, Dr P, Anouch', l'Ôdréééé, Flo, Jul', Ben (Felix-Bernard), Pierre-Alain, JB et tant d'autres.... nos années d'études (ou pas) s'éloignent mais nous ne nous voyons pas toujours autant, mais toujours autant de plaisir. Que cela continue ainsi. Votre soutien a été inflexible et j'ai hâte de repartir avec vous dans nos folles aventures*

*A Fred, Eva et Matteo*

*Que te dire Fred, une amitié de 20 ans, ça ne se refait pas.... vous avez toujours été là et j'espère que nous serons encore tous là pour un moment. Ce n'est pas parce que vous êtes maintenant parents que nous ne serons plus amis !!!( ☺ )*

*A Claire, ton sourire restera graver à jamais dans notre cœur et dans nos pensées.*

*A tous ceux que je n'ai pas cités....vous êtes trop nombreux et mon cerveau est quelque peu défaillant ces derniers temps.*

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
I. INTRODUCTION.....	1
II. L'HEMATOPOÏÈSE.....	3
III. DEFINITION DE LA CELLULE SOUCHE HEMATOPOÏËTIQUE.....	6
IV. ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏËTIQUES ET COMPLICATIONS.....	10
A. <i>Différentes sources</i> .....	10
A1 Prélèvement médullaire.....	11
A2 Prélèvement de cellules souches périphériques.....	11
A3 Unité de sang de cordon ombilical.....	11
B. <i>Indications</i> .....	12
C. <i>Maladie du greffon contre l'hôte (GvH)<sup>25</sup></i> .....	13
V. ONTOGENESE DES LYMPHOCYTES.....	16
A. <i>Les modèles d'études de la lymphopoïèse</i> .....	16
B. <i>Progéniteur lymphoïde</i> .....	17
C. <i>Lymphocyte B<sup>36,37</sup></i> .....	18
C1 Différents stades de différenciation (Figure 5).....	19
C2 Régulation moléculaire (Figure 6).....	21
C3 Les sous-populations lymphocytaires.....	25
D. <i>Lymphocyte T<sup>57,58</sup></i> .....	26
D1 Des progéniteurs lymphoïdes vers la colonisation du thymus.....	26
D2 Différenciation intra-thymique <sup>58,61,62</sup> (Figure 7).....	27
D3 Régulation moléculaire.....	30
D4 Les sous populations lymphocytaires T <sup>80,81</sup> .....	32
E. <i>Lymphocyte NK<sup>82,83</sup></i> .....	33
E1 Aspect phénotypique.....	34
E2 Régulation moléculaire.....	36
VI. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE POST ALLOGREFFE.....	36
A. <i>Techniques employées pour le suivi de la greffe</i> .....	38
A1 Cytométrie en flux.....	38
A2 Biologie moléculaire / chimérisme.....	39
A3 Test fonctionnel.....	40
B. <i>Caractéristiques de la population étudiée</i> .....	41
B1 Caractéristiques de la population.....	42
B2 Question posée : Analyse statistique.....	45
C. <i>Analyse des sous-populations lymphocytaires</i> .....	46
C1 Impact du conditionnement.....	49
C2 Impact de la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte.....	53
C3 Utilisation de sérum antilymphocytaire.....	55
C4 Donneurs apparentés, non apparentés.....	56
C5 Compatibilité HLA.....	58
C6 Type de prélèvement Moelle ou CSP.....	59
C7 Impact de la GvH.....	63
C8 Infection à CMV.....	69
C9 Age du donneur et du receveur.....	73
C10 Quantité de cellules CD34+ administrée.....	76
C11 Rituximab.....	77
VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	79
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>83</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>A</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Indications d'allogreffe (D'après EBMT ) <sup>25</sup> .....	13
Tableau 2: Tableau récapitulatif des facteurs étudiés au cours de la greffe.....	41
Tableau 3: Caractéristique de la population étudiée .....	43
Tableau 4: Age des patients en fonction du conditionnement .....	50
Tableau 5: Proportion des infections à CMV en fonction du conditionnement.....	50
Tableau 6: Moyenne et Ecart type (S.D.) des sous populations lymphocytaires en fonction du conditionnement .....	A
Tableau 7 : Moyenne et Ecart type (S.D.) des sous populations lymphocytaires en fonction du conditionnement .....	B
Tableau 8 : Moyenne et Ecart type des sous-population lymphocytaire en fonction de la prophylaxie de la GvH.....	C
Tableau 9: moyenne et écart type des sous-populations lymphocytaires en fonction d'un conditionnement avec SAL.....	D
Tableau 10: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'origine du donneur chez des patients greffé 10/10 <sup>ème</sup> .....	E
Tableau 11 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'identité HLA chez les patients non apparentés .....	E
Tableau 12: Moyenne et écart type des sous population en fonction du type de greffe et de son origine.....	F
Tableau 13: Moyenne et écart type des sous populations lymphocytaires en fonction de la GvH aigüe .....	G
Tableau 14: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction du traitement de la GvH aigüe.....	H
Tableau 15: Moyenne et écart-type des sous-populations lymphocytaires en fonction du développement d'une GvH chronique .....	H
Tableau 16 : Moyenne et écart-type des sous-populations lymphocytaires en fonction de la sérologie CMVI	
Tableau 17 : Moyenne et sous-populations lymphocytaires en fonction d'une infection à CMV .....	I
Tableau 18: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'âge du donneur	J
Tableau 19 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'âge du receveur .....	K
Tableau 20 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de la dose de CD34+ injectée au patient.....	L
Tableau 21: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'utilisation du rituximab .....	L

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : L'hématopoïèse n'est pas un modèle totalement défini .....	4
Figure 2: Pyramide de l'hématopoïèse .....	5
Figure 3: De la cellule souche vers les lignées hématopoïétiques. Marqueurs phénotypiques des lignées ....	7
Figure 4 : Deux mécanismes de division asymétrique. (D'après Wilson et al) <sup>10</sup> .....	9
Figure 5 : Phénotype cellulaire au cours de la différenciation lymphocytaire B.....	20
Figure 6 : Facteurs influençant la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse (D'après T Lebien, chap 76, Williams Hematology 7th <sup>55</sup> ).....	25
Figure 7: Tableau récapitulatif de la différenciation T au sein du thymus.....	29
Figure 8 : Facteurs de transcription au cours de la différenciation T .....	32
Figure 9: Aspect phénotypique de la différenciation NK. ....	35
Figure 10: Cinétique de la reconstitution immunitaire au cours de la greffe et du risque infectieux concomitant à l'immunodépression (D'après Revillard) <sup>86</sup> .....	37
Figure 11 : Numération lymphocytaire en box-plot.....	47
Figure 12 Numération des lymphocytes et des sous populations entre 1 et 12 mois post allogreffe. ....	48
Figure 13 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du conditionnement. (ANNEXE A).....	51
Figure 14: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction des différents conditionnements. (ANNEXE B) .....	52
Figure 15 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction des différentes prophylaxies de la GvH (ANNEXE C) .....	54
Figure 16 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'utilisation de sérum antilymphocytaire (ANNEXE D).....	55
Figure 17 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'origine du donneur chez des patients greffés 10/10 <sup>ème</sup> (ANNEXE E) .....	57
Figure 18: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'identité HLA chez des patients non apparentés (ANNEXE E) .....	58
Figure 19 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du type de greffe (ANNEXE F) .....	60
Figure 20 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du type de greffe et de l'origine du donneur (ANNEXE F) .....	62
Figure 21: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du développement d'une GvH aigüe (ANNEXE G).....	64
Figure 22: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du grade de la GvH aigüe (ANNEXE G) .....	65
Figure 23: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du traitement de la GvHa (Annexe H).....	67
Figure 24: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la GvH chronique .....	68
Figure 25 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la sérologie CMV (Annexe I) .....	70
Figure 26: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'infection à CMV (Annexe I).....	72
Figure 27: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'âge du donneur .....	74
Figure 28: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'âge du receveur.....	75
Figure 29: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la quantité de CD34 injectées par Kg de poids du receveur. ....	76
Figure 30: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du rituximab .....	77

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

<b>ABC</b>	ATP-Binding-Cassette
<b>BCR, TCR</b>	Récepteur du lymphocyte B, Récepteur du lymphocyte T
<b>BFU-E</b>	Burst Forming Unit Erythroblast
<b>CD</b>	Cluster de differentiation
<b>CFC</b>	Colony Forming Cell
<b>CFU-E ; CFU-GM</b>	Colony Forming Unit Erythroblast ; Granulocyte-Monocyte
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>CSH</b>	Cellules souches hématopoïétiques
<b>CSP</b>	Cellules Souches Périphériques
<b>CSP</b>	Cellules Souches Périphériques
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Virus
<b>FACS</b>	Fluorescent Activating Cell Sorting
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Cell stem factor
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Monocytes Cell Stem Factor
<b>GvH</b>	Graft vs Host disease. Maladie du greffon contre l'hôte
<b>GvT ;GvL</b>	Graft vs Tumor (Leukemia). Effet greffon contre Tumeur (Leucémie)
<b>HLA ou CMH</b>	Human Leucocyte Antigen ou Complexe Moléculaire d'Histocompatibilité
<b>LTC IC</b>	Long term colony –initiating cell
<b>NOD-SCID</b>	Non Obese Diabetes – Severe Combined ImmunoDeficiency
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>RAG</b>	Recombination activating gene

<b>SDF-1(CXCL12)</b>	Stromal derived factor 1
<b>sIg</b>	Immunoglobuline de Surface
<b>TDT</b>	Terminal Deoxynucléotide Transférase
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>VLA</b>	Very late antigen
<b>ψLC</b>	Pseudo chaine légère

## **I. Introduction**

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapeutique innovante, basée sur la connaissance tant hématologique qu'immunologique des différents compartiments cellulaires de l'hématopoïèse. A la différence de la transfusion, au cours de laquelle nous cherchons à apporter des éléments cellulaires non nucléés au patient, le but de la greffe de CSH est double :

- Dans le cas d'une anomalie congénitale des cellules hématopoïétiques (les cas les plus médiatiques sont les déficits immunitaires combinés sévères (enfants bulles)), le but sera de remplacer les cellules du patients incapables de fonctionner correctement par les cellules issues d'un donneur sain, afin d'apporter une immunité anti-infectieuse fonctionnelle.
- Dans le cas d'une hémopathie maligne, la greffe de CSH est aussi une immunothérapie adjuvante à la chimiothérapie afin d'éliminer les cellules malignes, mais elle assure aussi le repeuplement de la moelle osseuse par des cellules saines qui ont été épuisées par la maladie et son traitement.

Ainsi, la greffe de CSH est un évènement actif qui a pour but d'implanter un « pool » de cellules capables de s'autorenouveler et de se recréer le tissu hématopoïétique aussi fonctionnel que celui présent la greffe. Cette thérapeutique est multidisciplinaire et fait appel à l'ensemble des compétences de divers services : les services cliniques, qui accueillent le patient et assurent le diagnostic, les services de transplantation, services spécialisés dans la réalisation, le suivi et les complications de la greffe, les laboratoires d'hématologie, immunologie, et génétique qui assurent la compatibilité du greffon, permettent le suivi de la reconstitution du système immunitaire et hématopoïétique ainsi que l'évolution des cellules sanguines et médullaires du donneur par rapport aux cellules du receveur ; enfin l'unité de préparation du tissu cellulaire, assurant le prélèvement et les transformations du produit cellulaire du donneur afin qu'il puisse être réinjecté au receveur en garantissant la qualité d'un produit pharmaceutique.

Outre sa multidisciplinarité, les connaissances scientifiques sur le fonctionnement des cellules souches, de la niche hématopoïétique et de l'immunologie des greffes laissent entrepercevoir de nouvelles applications, notamment dans les complications immunologiques



de la greffe mais également dans des pathologies telles que les maladies auto-immunes et inflammatoires.

Dans le cadre de cet exercice, mon travail s'est porté sur la reconstitution des sous-populations lymphocytaires au sein d'une population de patients qui ont bénéficié d'une allogreffe de CSH. Il s'articulera sur trois points :

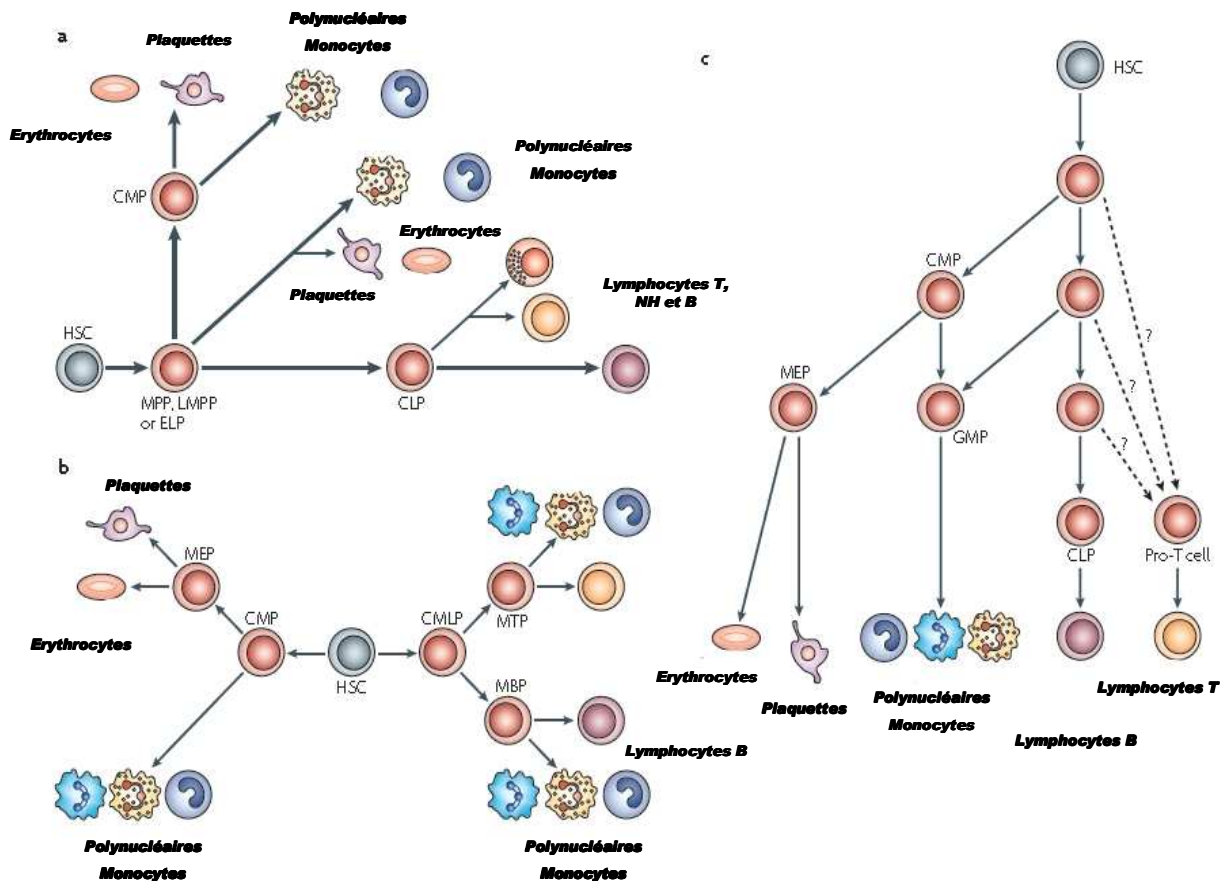
- L'hématopoïèse, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et sa principale complication la maladie du greffon contre l'hôte.
- Un rappel sur la lymphopoïèse des trois lignées lymphocytaires.
- L'analyse de la reconstitution lymphocytaire au sein d'une cohorte de 60 patients en comparaison avec les données de la littérature.

## **II. L'hématopoïèse**

Le système hématopoïétique et immunitaire est probablement, un des systèmes cellulaires les plus étudiés. L'hématopoïèse permet, chaque jour, la production chez l'adulte de  $200.10^9$  hématies, assurant le transport de l'oxygène, de  $125.10^9$  plaquettes nécessaires à la préservation de l'intégrité des vaisseaux, et enfin de  $50.10^9$  leucocytes. Le terme de leucocytes (ou globules blancs) désigne l'ensemble des populations cellulaires impliquées dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. On distingue les polynucléaires (granulocytes), qui doivent leur nom à l'aspect lobé de leur noyau (ou leur nombreuses granulations), et comprennent les neutrophiles (60 à 70% des leucocytes du sang chez l'adulte), les éosinophiles (3%) et les basophiles (moins de 1%). Ces cellules sont des phagocytes professionnels qui interviennent dans la réponse immunitaire innée en libérant le contenu de leurs granules. L'ensemble monocytes circulants et macrophages tissulaires constitue le système mononucléé macrophagique (SMM) ou système réticulo-histiocytaire. Les monocytes (8%-15% des leucocytes) ont une présence de 4 à 10h dans le sang. Lorsqu'ils quittent la circulation sanguine, ces cellules se transforment soit en macrophages, soit en cellules dendritiques. Les premières assurent des fonctions de phagocytose (dirigée notamment contre les bactéries, les protozoaires, les cellules cancéreuses et les corps apoptotiques), les secondes sont des cellules présentatrices de l'antigène. La dernière grande famille de leucocytes est constituée des lymphocytes, qui représentent environ 25% des globules blancs. Les lymphocytes T (T pour thymus) sont les plus abondants (70 – 80%), les cellules tueuses naturelles NK (Natural Killer) et les lymphocytes B (B pour Bone marrow) sont en nombres beaucoup plus restreints (7-18% et 5-15% respectivement). Les lymphocytes B, au stade de plasmocytes, sécrètent des anticorps et sont ainsi les acteurs de l'immunité humorale, dirigée notamment contre les pathogènes extracellulaires. Les lymphocytes T sont sous-divisés en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, acteurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et dirigés contre les pathogènes intracellulaires (virus) en lymphocytes T auxiliaires CD4+ qui coordonnent la réponse immunitaire adaptative. Les cellules NK définissent un troisième type de lymphocytes impliqués dans la surveillance immunitaire anti-tumorale et anti-virale.<sup>1</sup>

L'ensemble des cellules circulantes dérive d'une population rare de cellules multipotentes, les CSH. Ces cellules sont capables de se renouveler de manière autonome ou de se différencier en cellules sanguines matures. Chez l'homme, ce processus débute dans le sac vitellin, il migre dans le foie et la rate avant de gagner progressivement la moelle osseuse

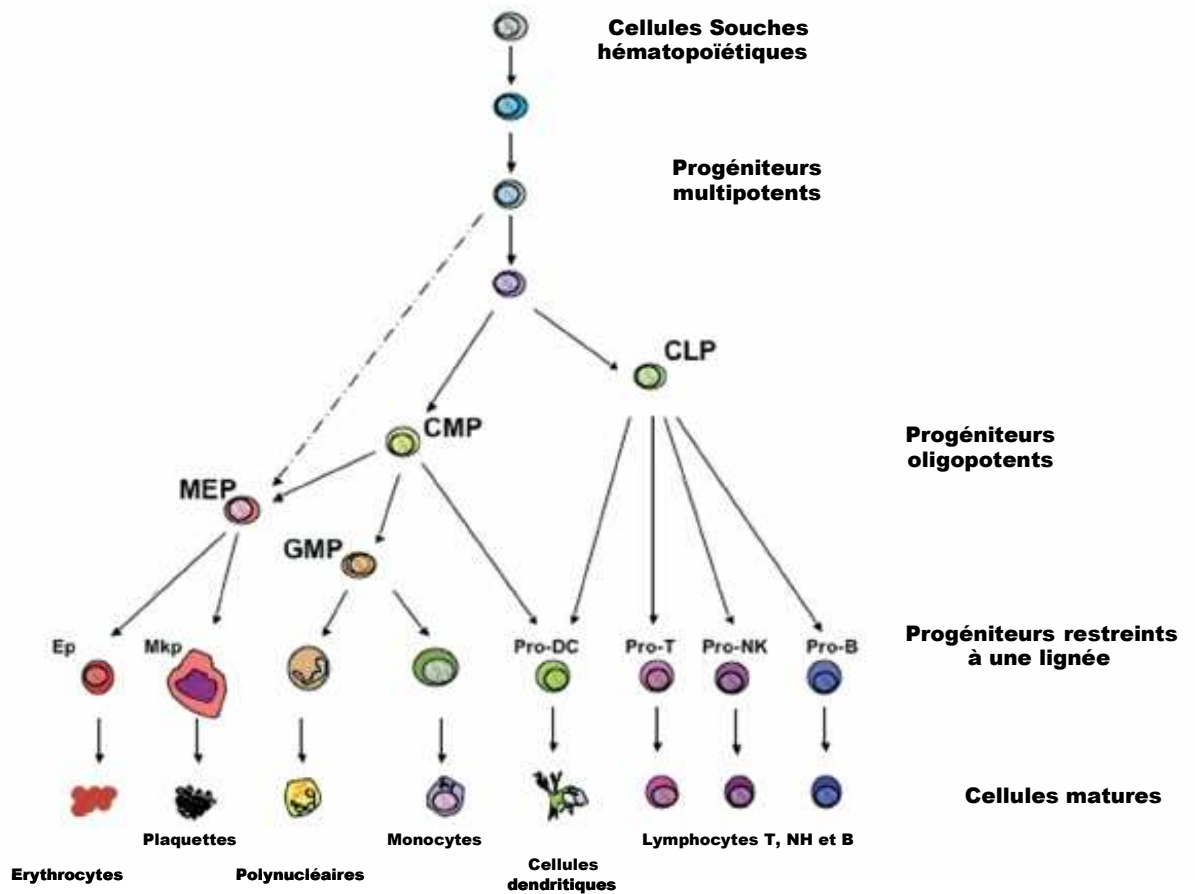
(10<sup>ème</sup> semaine de grossesse). Le modèle actuelle de l'hématopoïèse n'est pas encore totalement bien défini (figure 1), parce qu'il existe une disparité dans la manière d'étudier l'hématopoïèse et que les progéniteurs hématopoïétiques présentent une grande plasticité. Des séquences successives de différenciation et de prolifération passent par des progéniteurs oligoclonaux et aboutissent à une hématopoïèse harmonieuse couvrant l'ensemble des populations sanguines (Figure 2).



**Figure 1 : L'hématopoïèse n'est pas un modèle totalement défini**

*Le modèle de l'hématopoïèse est souvent considéré comme un modèle binaire (modèle de Weissman). Le modèle binaire (a) propose une dichotomie précoce entre les lignées myéloïdes et lymphoïdes. Le modèle (b) propose l'existence d'un précurseur commun à l'ensemble des lignées leucocytaires, qui conserve la capacité de générer les lignées myéloïdes et lymphoïdes, mais propose également un précurseur commun myéloïde, seul capable de générer les lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire. Le modèle (c) propose la perte de certaines capacités de différenciation par le progéniteur au fur et à mesure de son développement. Il perd très tôt la capacité érythro-mégacaryocytaire, plus tardivement la capacité myéloïde.*

CLP : progéniteur lymphoïde commun. CMP : progéniteur myéloïde commun. MPP : progéniteur multipotent. ELP : progéniteur précoce lymphoïde LMPP : progéniteur multipotent engagé vers la voie lymphoïde. MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire. MBP : progéniteur myéloïde et lymphoïde B. MTP : progéniteur myéloïde et lymphoïde T



**Figure 2: Pyramide de l'hématopoïèse**

*CLP : Progéniteur lymphoïde commun ; CMP : progéniteur myéloïde commun ; MEP : Progéniteur érythro-mégacaryocytaire ; GMP : progéniteur de la lignée granulocytaire et monocytaire. DC : Cellule dendritique*

Représentation de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique vers les cellules matures. (D'après Weissman<sup>2</sup>)

Pour obtenir cette pyramide inversée, les cellules sont exposées à différents stades de maturation à des mécanismes de régulation fins et contrôlés, actuellement très étudiés afin d'améliorer la compréhension de l'hématopoïèse et la thérapeutique cellulaire hématologique (Figure 2).

### III. Définition de la cellule souche hématopoïétique

Les CSH sont des cellules identifiées rétrospectivement par l'étude de différentes fractions cellulaires triées positivement au sein d'une population CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>. Les modèles utilisés pour l'étude des cellules hématopoïétiques sont très variés :

- Le modèle de culture cellulaire *in vitro* permet la génération de différents types de colonies sous l'influence de facteur de croissance : BFU-E (Burst Forming Unit Erythroblast) et CFU-E (Colony forming unit-Erythroblast) sous l'influence d'érythropoïétine, CFU-GM (Granulocyte-monocyte) sous l'influence de GM-CSF (Granulocyte monocyte Cell Stem Factor) etc... Ce modèle permet d'étudier la formation des cellules myéloïdes. L'utilisation de dilution limite permet de définir quelle proportion de cellules sont capables de générer l'ensemble des lignées
- Le modèle de culture *in vitro* sur lignée cellulaire issue de stroma médullaire de rat en présence de cytokines et de facteurs de croissance. Ce modèle permet d'étudier la lymphopoïèse B et NK, bien que cette dernière soit stroma indépendante. Il permet d'étudier l'initiation de la lymphopoïèse T si la lignée stromale exprime un ligand adéquat à la différenciation T. Enfin, nous pouvons étudier par dilution limite les précurseurs capables de générer à la fois des cellules myéloïdes et des cellules lymphoïdes en amont des progéniteurs oligoclonaux, ce sont les LTC-IC (Long Term Culture- Initiating Cell).
- Les modèles d'organoculture à partir de thymus foetal ou de foie foetal permettent d'étudier la lymphopoïèse dans un système mimant les interactions réelles entre les précurseurs et le stroma cellulaire naturel.
- « **Le GOLD STANDARD** » correspond à la repopulation du compartiment hématopoïétique par des CSH humaine en compétition avec des CSH de souris au sein de souris immunodéprimées de type NOD-SCID (Non Obese Diabetic - Severe Combined immunodeficiency). Après traitement myéloablatif (5-Fluorouracile ou irradiation d'une souris), on injecte une quantité définie de CSH humaine et on évalue dans la moelle ou le sang périphérique les cellules issues de la souris et celles issues des CSH.

Il est impossible de trier les CSH mais celles-ci appartiennent par contre à un compartiment cellulaire défini enrichi. L'étude du phénotype par cytométrie de flux et son

association à un trieur de cellules permet ainsi d'isoler des compartiments cellulaires enrichis en CSH.

Le premier marqueur utilisé pour étudier les CSH a été découvert par immunisation de souris par une lignée de cellules leucémiques : il correspond au CD34. C'est une sialomucine dont le rôle n'est pas encore connu<sup>3</sup>. Ce marqueur est habituellement utilisé pour identifier les CSH, mais il n'est pas spécifique, il est exprimé également par les cellules endothéliales<sup>4-6</sup>. Son expression est restreinte à moins de 1% des cellules médullaires. Ce sont essentiellement les cellules capables de générer *in vitro* les LTC-IC et les CFC. Malheureusement, un unique marqueur ne permet pas d'isoler ces cellules multipotentes. Il faut pouvoir éliminer les marqueurs spécifiques de lignées, marqueurs présents sur les cellules matures et en cours de différenciation (figure 3)

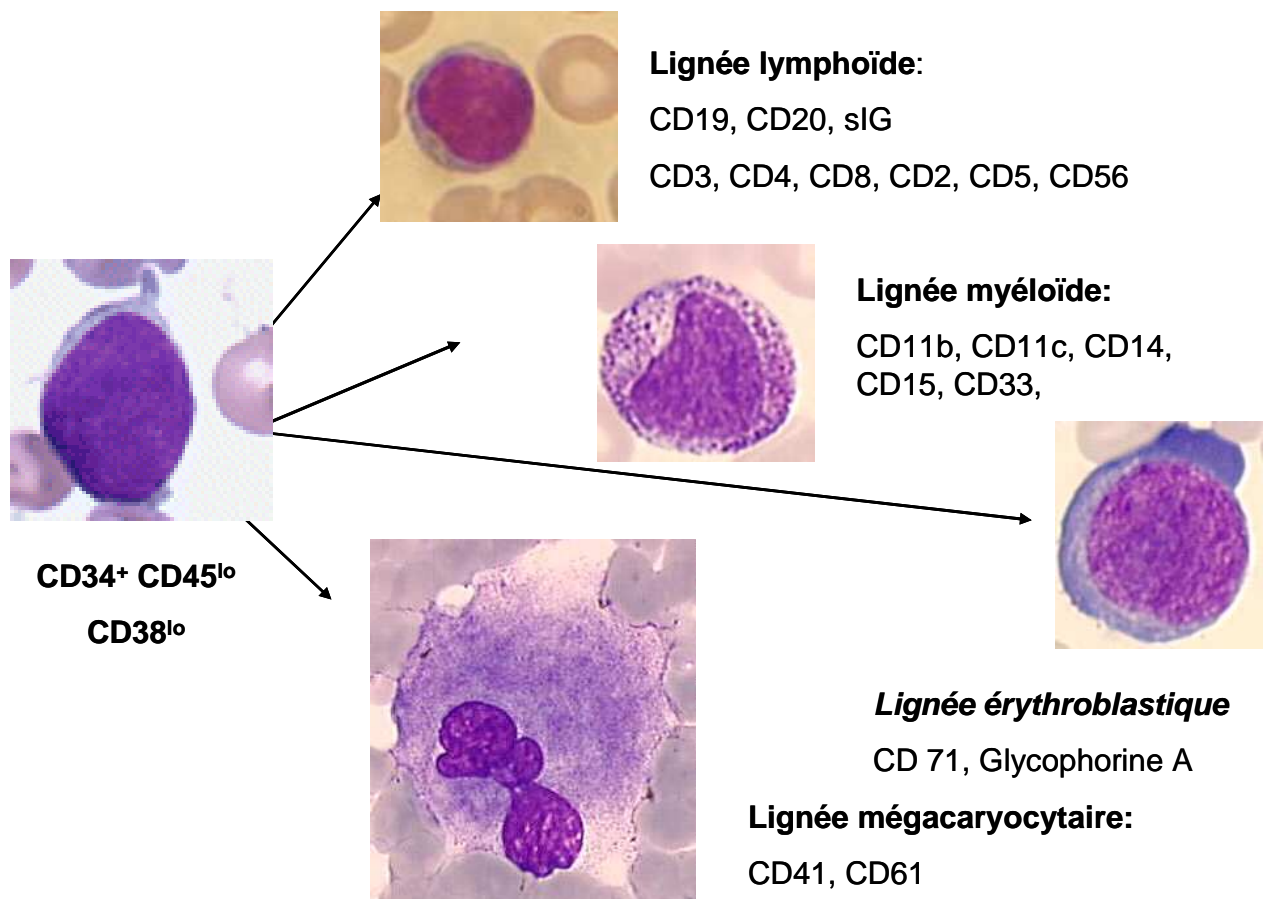


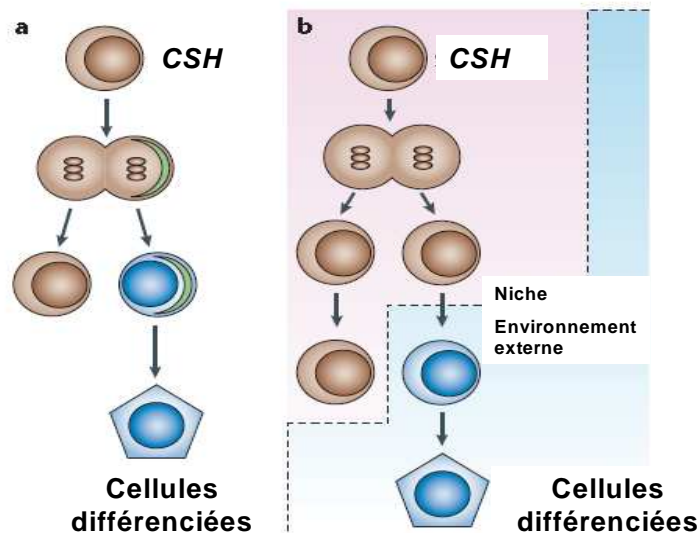
Figure 3: De la cellule souche vers les lignées hématopoïétiques. Marqueurs phénotypiques des lignées

Elles expriment faiblement CD45 (marqueur pan-leucocytaires) mais n'expriment pas (ou faiblement) le CD38, un marqueur membranaire associé à l'engagement vers une lignée ou à une forte activité de cycle cellulaire. Or les CSH sont des cellules quiescentes. Plus

récemment, Gallacher an al.<sup>7</sup> a décrit l'expression du CD133 sur les cellules CD34<sup>+</sup> supposée être les CSH. Les CSH expriment des protéines comme les ATP binding cassette (ABC), protéine permettant l'efflux de xénobiotiques, notamment certaines molécules employées en chimiothérapie anticancéreuse ou certains marqueurs vitaux fluorescents comme l'Hoechst 33342 (expulsé par ABCG2) qui marquent l'ADN ou la rhodamine 123 (expulsée par la P-glycoprotéine) qui est un marqueur des membranes mitochondriales. Ce marquage a permis de démontrer l'existence d'une population de CSH dite SP (Side Population) qui expulse à la fois la rhodamine 123 et l'Hoechst et qui n'exprime ni le CD34, ni le CD133. Cette population SP est faiblement clonogénique et ne forme des colonies qu'après une longue culture sur stroma médullaire<sup>8</sup>. Cette fraction s'avère probablement enrichie en « vraies » CSH.

Ces cellules sont définies par trois capacités :

- Autorenouvellement : Les CSH effectuent une division asymétrique pour pouvoir s'autorenouveler. Cette division est caractérisée par la formation d'une cellule ayant conservé son caractère de cellule souche et d'une cellule qui va entrer dans un processus de prolifération et de différenciation. Ce mécanisme permet d'entretenir un « pool » de cellules souches : cette capacité de régénérer un ensemble de cellules à partir d'un faible nombre est mise à profit au cours des autogreffes afin de pouvoir intensifier la chimiothérapie anticancéreuse mais également dans les allogreffes, afin de reconstituer de manière pérenne l'ensemble des éléments hématopoïétiques. Cette division asymétrique pourrait être obtenu par de deux mécanismes<sup>9</sup> (Figure 4).
- Multipotence : Les CSH sont à l'origine des différentes lignées hématopoïétiques, en fonction des différents signaux qu'elles peuvent percevoir : facteurs de croissance, cytokines et apparentées vont induire des facteurs de transcription activant un programme de renouvellement ou de différenciation.



**Figure 4 : Deux mécanismes de division asymétrique. (D'après Wilson et al)<sup>10</sup>**

*a : La division asymétrique est le résultat d'une répartition inégale des constituants cellulaires (protéines, golgi, ribosomes et ARNm)*

*b : La division est symétrique mais une des deux cellules quitte la niche soit parce que la division a lieu à la limite de la niche, soit parce que les interactions avec la niche ne sont plus réalisées (axes mitotiques)*

- Migration :** les CSH sont des cellules migrantes : nous pouvons les observer dès la formation du système hématopoïétique : l'hématopoïèse débute dans le sac vitellin, migre vers le foie et la rate et rejoint définitivement son organe principal : la moelle osseuse. La migration des CSH est un processus physiologique, ce qui explique la présence de CSH en faible quantité dans le sang périphérique. Cette migration est d'ailleurs mise à profit dans la greffe de CSH puisqu'une réinjection intra-osseuse n'est pas nécessaire. Les propriétés de migration de ces cellules sont, en partie, attribuables au couple d'une chimiokine et de son récepteur CXCL12 (SDF-1)/CXCR4. Cette cytokine, impliquée dans la domiciliation (homing), est produite de manière constitutive par le stroma et les ostéoblastes immatures de la niche. Ainsi, les CSH greffées par voie intraveineuse vont migrer vers la moelle osseuse<sup>11</sup>. Cette propriété est également mise à profit dans le recueil des CSH après stimulation par le G-CSF. La stimulation par le G-CSF va favoriser la sécrétion de protéases (notamment MMP9) qui clivent différentes protéines d'interactions comme le SDF membranaire et VCAM : cela permet ainsi de libérer les cellules vers la circulation périphérique<sup>12,13</sup>. Cependant, dans un modèle de KO du gène *CXCR4* chez la souris, les cellules conservent leur migration mais leur rétention au sein de la moelle est restreinte.<sup>14</sup> D'autres molécules comme VLA4/VCAM-1 et CD44/Acide hyaluronique sont des facteurs de contact entre le stroma et la CSH.<sup>15</sup> Cibler ces molécules s'avère



utile dans la mobilisation des cellules souches en vue d'un prélèvement de cellules souches périphériques (CSP).

Les CSH sont présentes dans des unités anatomiques dénommées niches hématopoïétiques, concept développé par Schofield en 1978.<sup>16</sup> La niche est encore aujourd'hui mal connue. Différentes niches ont été caractérisées, l'une située au niveau de l'os trabéculaire, à proximité de l'endoste<sup>17</sup>, une autre a été localisée à proximité des vaisseaux médullaires<sup>18</sup>.

Dans les deux cas, ces zones protégées sont le siège de la migration des CSH et de l'interaction de CSH avec diverses molécules permettant le maintien de ces trois propriétés caractéristiques des CSH.

## **IV. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et complications**

### **A. Différentes sources**

La greffe de CSH est une thérapeutique cellulaire et tissulaire tout comme la greffe d'organe. La particularité de la greffe de CSH, à la différence d'une greffe d'organe, est d'apporter des cellules souches multipotentes capables de régénérer le tissu hématopoïétique non fonctionnel dans son intégralité. Au sein du prélèvement de moelle osseuse ou du prélèvement de CSP après stimulation par un facteur de croissance (G-CSF) et recueilli par cytophérèse, on distingue différents types cellulaires :

- ✓ Des cellules, exprimant fortement le CD45, qui sont des cellules matures ou en fin de maturation. Parmi ces cellules se trouvent des lymphocytes immunocompétents, responsables à la fois de l'action anti-tumorale et de la maladie du greffon contre l'hôte (GvH). Ces cellules ont une durée de vie limitée mais participent à la prise de greffe sans permettre pour autant de reconstituer l'hématopoïèse.

- ✓ Des cellules immatures, exprimant le CD34, souvent le CD38, engagées vers une des différentes lignées hématopoïétiques, que l'on peut reconnaître en cytométrie de flux par l'expression de marqueurs spécifiques des lignées engagées (Figure 3). Ces cellules aident à la reformation des lignées de manière précoce mais ne peuvent pas maintenir une hématopoïèse constante et définitive.

- ✓ Des cellules immatures,  $CD34^+CD38^{lo}Lin^-$ . Ce compartiment contient les CSH à caractère multipotent.

Les sources de CSH se sont diversifiées avec la compréhension de l'hématopoïèse. A l'heure actuelle, il existe trois sources de CSH : les CSH issues d'un prélèvement médullaire, les CSH recueillies dans le sang périphérique après mobilisation avec le G-CSF (ou d'autres molécules dont les inhibiteurs de CXCR4, comme le plérixafor) et celles issues de sang de cordon ombilical.

### **A1 Prélèvement médullaire**

Le type de prélèvement le plus ancien est un prélèvement de moelle osseuse chez un donneur sain au niveau des crêtes iliaques. Il est effectué sous anesthésie générale et nécessite un bloc opératoire. Ce prélèvement contient un nombre plus limité de cellules CD34<sup>+</sup> ( $2,8 \cdot 10^6$ /kg de poids du receveur) que le prélèvement par CSP (3 fois moins) mais il est constitué de moins de cellules nucléées totales dont 5 à 10 fois moins de lymphocytes T et NK, 4 à 18 fois moins de lymphocytes B mais il contient plus de progéniteurs engagés vers la lignée lymphocytaire B<sup>19-21</sup>.

### **A2 Prélèvement de cellules souches périphériques**

Le prélèvement le plus courant actuellement, notamment pour les autogreffes, correspond au recueil de CSH au sein du sang périphérique, après mobilisation par un facteur de croissance, le G-CSF ou après chimiothérapie (cas des autogreffes). Quelques jours (4 à 5) après le début de la stimulation, le prélèvement des cellules souches est effectué par cytophérèse. Ce prélèvement est plus riche en cellules CD34<sup>+</sup> ( $3$  à  $7 \cdot 10^6$ /kg de poids de receveur) que la moelle osseuse mais aussi en autres cellules nucléées (lymphocytes T, B, monocytes). Il est plus riche en progéniteurs myéloïdes (CD34<sup>+</sup>CD13<sup>+</sup>) que la moelle osseuse<sup>19-21</sup>. De plus, il est moins traumatique pour le donneur bien qu'il soit soumis aux effets indésirables du G-CSF.

### **A3 Unité de sang de cordon ombilical**

Le troisième type de prélèvement est effectué juste après la naissance. En effet, il consiste à récupérer les cellules hématopoïétiques présentes dans le sang du cordon ombilical. Bien que le volume soit faible, il est proportionnellement plus riche en cellules CD34<sup>+</sup> que la moelle osseuse. Cependant, la quantité de cellules CD34<sup>+</sup> est souvent insuffisante pour une greffe ( $0,2 \cdot 10^6$ /kg) : il est donc souvent nécessaire de combiner deux sangs de cordons. Il présente l'avantage d'avoir un risque d'exposition infectieux moindre, d'être disponible immédiatement au moment de la recherche (Il ne nécessite pas d'attendre le don) et de tolérer

des incompatibilités HLA plus importante : 4/6ème contre 9/10 ou 10/10<sup>ème</sup> pour une CSP ou une moelle. Cette explication provient probablement du caractère naïf des lymphocytes et d'une forte proportion de cellules T régulatrices<sup>22,23</sup>. Enfin, La population cellulaire du sang de cordon ombilical est probablement plus pluripotentes<sup>24</sup>, ce qui explique la réussite de la greffe malgré la faible cellularité du prélèvement.

## **B. Indications**

Les indications de la greffe de CSH sont assez importantes puisqu'elles regroupent des pathologies hématologiques et immunologiques non malignes (Drépanocytose, SCID, ...) et des pathologies malignes (Leucémies, sarcome,...) détaillées dans le tableau 1.

Le donneur ou le sang de cordon va être choisi en fonction de la compatibilité avec les avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I HLA-A, B, C et des molécules du CMH de type II HLA-DR et DQ du receveur.

La greffe allogénique de moelle osseuse peut être réalisée de deux manières différentes :

- La greffe allogénique avec un donneur apparenté (familial) : le donneur issu de la fratrie peut hériter du même haplotype paternel et maternel HLA (1 chance sur 4) que le receveur, l'allogreffe est dite géno-identique. Si le donneur n'a qu'un seul haplotype commun avec le receveur (cas des parents ou des enfants du receveur), la greffe est dite haplo-identique mais nécessite une déplétion en cellules T CD3<sup>+</sup> car l'incompatibilité HLA est génératrice d'une GvH très importante et souvent fatale.
- La greffe allogénique avec un donneur non apparenté (greffe phéno-identique) : Le donneur est recherché sur des bases de données nationales et internationales en fonction des compatibilités HLA.

Une fois la compatibilité réalisée, le recrutement du donneur est effectué. Le prélèvement sera effectué sur site (familial) ou dans le centre préleveur ayant enregistré le donneur (Don volontaire de moelle osseuse).

Finalement, le greffe va commencer par le conditionnement. C'est une étape clé de la greffe, car elle permet à la fois de traiter la maladie (dans le cas d'une maladie maligne), et d'éliminer les cellules du receveur dans la moelle osseuse afin de favoriser la colonisation par les cellules du donneur; dans de rares pathologies, le système immunitaire défectueux ne peut pas réagir vis-à-vis du greffon et le conditionnement est inutile.

Cependant, le conditionnement est un évènement initial qui, malheureusement, favorise une complication importante de l'allogreffe de CSH, la maladie du greffon contre l'hôte.

**Tableau 1: Indications d'allogreffe (D'après EBMT )<sup>25</sup>**

<b>LEUCEMIES</b>  <b>70 ,2%</b>	Leucémies aigües myéloïdes
	Leucémies aigües lymphoblastiques
	Leucémies myéloïdes chroniques
	Myélodysplasies/syndrome myéloprolifératifs ; leucémies aigües secondaires à ces pathologies
	Leucémies lymphoïdes chroniques
<b>SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS ET HEMOPATHIES PLASMOCYTAIRES</b>  <b>16,5%</b>	Myélome
	Hémopathie plasmocytaire autre
	Lymphome de Hodgkin
	Lymphome non Hodgkinien
<b>MALADIES HEMATOLOGIQUES OU IMMUNOLOGIQUES NON MALIGNES</b>  <b>11 ,4%</b>	Aplasie médullaire
	Hémoglobinopathies
	Déficit immunitaire
	Maladie métabolique (Maldie de Hurler, Maladie de Wolman)
<b>TUMEUR SOLIDE</b>  <b>0,9%</b>	Neuroblastome, Sarcome d'Ewing, Sarcome des tissu mous, Cancer du sein
<b>AUTRES 1%</b>	

### **C. Maladie du greffon contre l'hôte (GvH)<sup>25</sup>**

La GvH est un syndrome lié à l'agression des tissus du receveur par les cellules immunocompétentes du donneur. La GvH demeure à l'heure actuelle une limitation importante au succès des allogreffes, notamment dans les formes sévères. Historiquement, au cours des premières allogreffes, les receveurs recevant une moelle autre que celle d'un donneur jumeau monozygote développait une pathologie dénommée « maladie secondaire ».

Ainsi trois conditions sont nécessaires au développement d'une GvH :

- L'administration de cellules immunocompétentes au sein du greffon
- L'histo-incompatibilité entre donneur et receveur : Cette pathologie peut apparaître chez le receveur en dépit d'une thérapie immunosuppressive importante et bien que le donneur soit HLA géno-identique avec le receveur. Outre le rôle des molécules du CMH, les tissus expriment des antigènes mineurs d'histocompatibilité, pour lesquels aucune alloréactivité n'est recherchée. Ces antigènes d'histocompatibilité dits mineurs (MiHA) sont présentés par les cellules présentatrices de l'antigène du receveur aux lymphocytes T matures du donneur qui accompagnent les CSH dans le greffon. Ces peptides antigéniques, issus de protéines intracellulaires, diffèrent entre donneur et receveur car il existe au sein de leur séquence un polymorphisme (ou parce qu'ils sont codés chez le receveur masculin par le chromosome Y absent chez le donneur féminin). Ainsi, il se crée une incompatibilité histologique qui aboutit à une réaction immunitaire.
- L'incapacité du receveur à détruire ou inactiver les cellules transplantées suite au conditionnement.

La GvH regroupe 2 syndromes distincts : la GvH aiguë (GvHa) et la GvH chronique (GvHc). Ces deux pathologies diffèrent en général par leur vitesse d'apparition, leur symptomatologie, leur étiologie mais sont néanmoins étroitement associées.

A la GvH est associé un effet bénéfique, l'effet du greffon contre la tumeur (GvT) ou greffon contre la leucémie (GvL). Cet effet correspond à l'immunothérapie de l'allogreffe dans les traitements des hémopathies malignes. En effet, la niche hématopoïétique est aussi une niche pour les cellules souches leucémiques qui ont tendance, non seulement à coloniser la niche à la place des cellules souches saines mais également à les attirer afin d'épuiser leur capacité d'autorenouvellement<sup>26</sup>. Ainsi, en apportant des cellules immunocompétentes avec les CSH, on favorise l'effet GvL, afin de « nettoyer », par un mécanisme d'alloréactivité, les cellules n'ayant pas été éliminées par le traitement préalable. Cet effet est aussi recherché dans le cadre des réinjections de lymphocytes du donneur (DLI). En effet, à l'initiation d'une rechute ou lors d'une mauvaise prise de greffe (chimérisme mixte), une diminution de l'immunosuppression médicamenteuse associée à l'injection de lymphocyte du donneur initial

est une solution pour combattre la rechute ou la mauvaise prise de greffe au dépend de favoriser parallèlement un effet GvH.

Le « Graal » des médecins greffeurs serait de pouvoir dissocier l'effet GvH de l'effet GvL.

La GvH aiguë survient durant les 100 premiers jours consécutifs à la greffe, et est caractérisée par une apoptose des cellules épithéliales cutanées, hépatiques (épithélium biliaire), et du tractus gastro-intestinal. Les manifestations cliniques comprennent éruption cutanée (rash maculo-papuleux douloureux), syndrome cholestatique et/ou atteinte intestinale (nausée, diarrhée aqueuse, crampes abdominales, iléus ou perforation intestinale). La GvH aiguë et ses complications sont responsables de 10 à 30% des décès consécutifs à une greffe allogénique<sup>25</sup>. Cependant ces manifestations peuvent s'étendre au-delà des cent premiers jours. Ainsi se définit une GvH aiguë classique (avant le 100<sup>ème</sup> jour) ou récurrente (au-delà de 100j).

D'un point de vue mécanistique, la GvH aiguë est un processus en trois phases :

- L'effet du conditionnement : Il déclenche une génération de grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'IL-1. Elles favorisent l'expression des molécules HLA, des molécules d'adhésion et activent les cellules présentatrices de l'antigène du receveur. Cette « tempête » cytokinique, en réaction aux lésions causées par les traitements successifs et le conditionnement, aboutit à une activation des lymphocytes T du donneur par les antigènes mineurs et le système HLA.
- L'activation des lymphocytes T : Les cellules T naïves du donneur dans ce milieu pro-inflammatoire vont interagir avec les cellules présentatrices de l'antigène de l'hôte conduisant ainsi à la sécrétion d'IL-2, d'interféron  $\gamma$  et de TNF $\alpha$  (profil Th<sub>1</sub>). Ceci favorise ainsi l'induction d'une réponse par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. Le profil Th<sub>1</sub> va conduire à la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-1 par les cellules macrophagiques.
- Phase effectrice : Ces cellules T activées vont induire l'apoptose des cellules de l'hôte par les couples Fas-FasL, Granzyme-perforine et le TNF $\alpha$ . Un second signal (LPS issu de bactéries intestinales) va activer les macrophages tissulaires et les lymphocytes associés conduisant à une amplification de la réaction. Ces lésions vont ainsi être à l'origine d'un second relargage de cytokines, entraînant un contexte favorable à l'extension de la maladie.

La GvH est donc la conséquence de l'expansion périphérique des lymphocytes T présents dans le greffon (voie thymo-indépendante) puisque la déplétion en lymphocytes T du greffon en réduit drastiquement l'incidence.

La GvH chronique est la première cause de mortalité tardive des patients sans rechute. Elle peut survenir en l'absence de GvH aiguë. Elle s'apparente à des maladies auto-immunes comme la sclérodémie, le syndrome de Sjögren, la cirrhose biliaire primitive, les cytopénies auto-immunes,... Ces symptômes sont souvent présents pendant trois ans et peuvent être inaugurés par une GvH aiguë. Les manifestations peuvent être localisée ou extensive. Les facteurs favorables au développement de la GvH chronique semblent être l'âge, les infusions de lymphocytes du donneur, l'utilisation d'un don non apparenté ou d'un greffon issu d'un recueil par CSP, l'antécédent de GvH aiguë<sup>25</sup>.

## **V. Ontogénèse des lymphocytes**

Le développement lymphocytaire est complexe et finement régulé. Différents régulateurs génétiques et épigénétiques vont permettre de définir le potentiel d'engagement d'une cellule vers une lignée et cela à chaque étape de son développement. La combinaison de stimuli du microenvironnement (cytokines, interaction cellules-stroma) va permettre de promouvoir la survie, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose. Ainsi, une cascade d'évènements intracellulaires régulés par les facteurs de transcription et la réponse aux signaux du microenvironnement permettra de créer un potentiel critique d'engagement vers une lignée.

### **A. Les modèles d'études de la lymphopoïèse**

Les modèles d'études de la lymphopoïèse sont variés et font appel à la culture *in vitro* et à des modèles *in vivo* en sein de souris immuno-déficientes. Avant toutes étapes, l'ensemble des techniques repose sur un tri cellulaire réalisé soit par FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) soit par sélection positive ou négative par des anticorps couplés à des billes magnétiques. Une fois la population cellulaire triée obtenue, on peut procéder à :

- Une différenciation *in vitro* sur des cellules de stroma médullaire murin en présence de cytokines : cellules MS5 ou S17 pour le développement lymphocytaire B, cellules OP9 transfectées par le ligand *delta-1* ou épithélium thymique pour le développement lymphocytaire T.

- L'organoculture : après prélèvement d'un tissu fœtal, on dépose les cellules à étudier sur celui-ci. Le tissu permet la sécrétion des cytokines appropriées et les interactions cellulaires plus adéquates que le stroma murin. Cette technique est beaucoup utilisée pour l'étude de la différenciation T.
- Les modèles in vivo : on injecte la population cellulaire à étudier à une souris immunodéficiente (NOD-SCID) après chimiothérapie (5-FU). Il se crée une compétition entre les cellules à étudier et les cellules de la souris.

Les cellules issues de ces modèles sont le plus souvent étudiées par cytométrie de flux et certains gènes caractéristiques du développement sont étudiés par biologie moléculaire. Afin de mieux comprendre l'impact de ces gènes, des modèles de souris KO (c'est-à-dire invalidés pour ces gènes) ont été créés.

L'ensemble des modèles et la variabilité au sein des techniques utilisées aboutit à une variation sur la définition des profils phénotypiques des différents stades de maturations.

## **B. Progéniteur lymphoïde**

Le développement des lignées lymphoïdes provient probablement d'une cellule ayant restreint son potentiel myéloïde. La recherche d'un progéniteur lymphoïde commun est depuis longtemps controversée. En effet, le modèle binaire de Weissman<sup>27</sup> chez la souris présentait la dichotomie lymphoïde/myéloïde comme une étape clé de la différenciation. A l'heure actuelle, il reflète bien l'hématopoïèse dans sa globalité mais les progéniteurs communs semblent conserver une plasticité importante permettant, par exemple, de se différencier vers une lignée myéloïde alors qu'elle s'engageait vers la lignée lymphoïde dans un modèle *in vitro*<sup>28</sup>. Ainsi les progéniteurs communs à la lignée myéloïde ou lymphoïde sont remis en cause dans l'espèce humaine.

La définition d'un progéniteur à potentiel lymphoïde ne fait pas l'objet d'un consensus. Le potentiel lymphoïde (au moins B et NK) semble appartenir aux cellules CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup><sup>29</sup>. L'expression du CD7 et du CD10 a pu être également mise en évidence au sein de population cellulaire de la moelle osseuse ou du sang de cordon, laissant entrevoir une population de progéniteur avec un potentiel biaisé B/T/DC CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>CD7<sup>+30-32</sup> ou un potentiel biaisé B CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>CD10<sup>+30</sup>. L'expression du CD45RA au sein de cellules issues de moelle osseuse fœtale serait associée à une perte de la reconstitution hématopoïétique à long terme et du potentiel de différenciation vers la lignée érythrocytaire<sup>29</sup>.



Au niveau moléculaire, différents facteurs de transcription semblent être importants dans la formation d'une cellule orientée vers le lignage myéloïde ou lymphoïde. PU.1 est un facteur de transcription restreint aux cellules hématopoïétiques. L'inactivation du gène chez la souris conduit à la mort fœtale de la souris avec un déficit en lymphocytes B, T, NK et une déplétion du pool de CSH<sup>33</sup>. La production de progéniteur multipotent est affectée avec notamment un défaut de réponse à l'IL-7 et au G-CSF, dont l'expression des récepteurs est régulée par PU.1. Le niveau d'expression de PU.1 semble être associé à l'engagement myéloïde au dépend de l'engagement lymphoïde : un niveau élevé est corrélé avec un engagement myéloïde, un niveau bas permet en fait l'action de facteurs de transcription nécessaire à un engagement lymphoïde<sup>33,34</sup>. Au niveau moléculaire, l'un des principaux facteurs influençant l'engagement vers une voie lymphoïde est Ikaros.

**Ikaros** est un facteur de la famille des Kruppel-like Zinc finger transcription family qui inclut également Hélios et Aiolos. Le gène *Ikzf1* code pour des isoformes multiples exprimées largement dans l'hématopoïèse que ce soit dans les programmes d'autorenouvellement ou parmi les progéniteurs engagés. L'absence d'expression d'Ikaros chez la souris induit l'absence de développement du progéniteur lymphoïde sans altération du développement myéloïde<sup>35</sup>.

### **C. Lymphocyte B**<sup>36,37</sup>

L'ontogénèse des cellules B se passe en deux principales phases, l'une est une phase de prolifération/différenciation du progéniteur lymphoïde ou lympho-myéloïde vers un lymphocyte immature, lymphocyte qui n'a pas encore rencontré l'antigène. L'autre est une phase d'éducation vis-à-vis des antigènes conduisant à un lymphocyte mature destiné à répondre à des stimuli spécifiques.

Au cours de l'embryogénèse, les lymphocytes B sont présents dans différents tissus. Dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation, des cellules pré-B sont détectées dans le foie fœtal, alors que les premières cellules B périphériques ne sont détectables qu'à partir de la 12<sup>ème</sup> semaine.

Ce développement devient multifocal avec présence de cellules B immatures dans la moelle osseuse, le foie, la rate, les reins et les poumons. Enfin, les cellules B se différencient uniquement au niveau de la moelle osseuse à partir des 5 derniers mois de la gestation et durant le reste de la vie.

Il est à noter que l'ensemble de la description ci-dessous n'est pas aussi nette. Il existe un continuum entre les cellules avec des phénotypes intermédiaires. L'ensemble est strictement

régulé par les phases de réarrangements des gènes des chaînes lourdes (H) au niveau des segments V (Variable, D (Diversité) et J (Jonction) puis au niveau des segments V et J pour les chaînes légères. Ces réarrangements sont nécessaires pour l'expression du récepteur des cellules B, le BCR et de son précurseur, le pré-BCR. Le BCR est un complexe moléculaire composée d'une immunoglobuline de surface et deux molécules responsables de la transduction du signal : CD79a (Ig $\alpha$ ) et CD79b (Ig $\beta$ ). Ces molécules permettent de déclencher la signalisation cellulaire après agrégation des BCR par l'antigène. Le pré BCR est composé des mêmes éléments que le BCR à l'exception des chaînes légères qui sont remplacées par des pseudo-chaînes légères ( $\psi$ LC) : VpreB et  $\lambda$ 5.

### **C1 Différents stades de différenciation (Figure 5)**

Les cellules CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>10<sup>+</sup> auraient une orientation du transcriptome typique de cellules Pro-B alors que les cellules CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>7<sup>+</sup> seraient restreintes à une expression T/NK<sup>31</sup>.

Le premier stade B (**Pré-pro-B**) se caractérise par l'absence de CD19 membranaire **CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>**. Le réarrangement DJ<sub>H</sub> des chaînes lourdes des immunoglobulines est initié, et on détecte l'expression intracytoplasmique d'éléments nécessaires au BCR, comme cCD79a, VpreB, une pseudo-chaîne légère ( $\psi$ LC) nécessaire au développement du pré-BCR.<sup>38</sup> L'activité des enzymes RAG 1 et 2 est détectable. (Ces enzymes permettent le réarrangement des chaînes des immunoglobulines et du TCR).

Les cellules **Pro B** sont des cellules **CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>**, elles expriment la TdT (Terminal Déoxynucleotide Transférase, une enzyme ajoutant des nucléotides au niveau du segment J afin d'augmenter la diversité du répertoire), le réarrangement est détecté. Elles expriment déjà les  $\psi$ LC. La majorité de ces cellules n'expriment ni la chaîne lourde  $\mu$  en intracytoplasmique, ni en surface.<sup>31,38,39</sup> L'expression de  $\psi$ LC à la surface de ces cellules est associée à une autre protéine gp130 dans les modèle murins, complexe ayant la possibilité de d'induire un influx de calcium intracellulaire.<sup>31,38-40</sup> Ce complexe pourrait être un « pré-BCR » du stade pro-B.

Au stade **pré-B** (CD34<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>), le réarrangement VDJ<sub>H</sub> est achevé et permet ainsi l'expression de la chaîne lourde H $\mu$  : les cellules perdent l'expression de CD34 et de la TdT. Elles arborent l'expression cytoplasmique de chaînes lourdes H $\mu$ . Ce stade se divise en en 2 sous populations, selon l'activité du cycle cellulaire et selon leur taille. Les **preB-I** sont de grandes cellules, exprimant le pré-BCR. Dès qu'un des allèles de la chaîne lourde est réarrangé, le pré-BCR est assemblé et le signal induit par le pré-BCR marque le bon

réarrangement  $VDJ_H$  des chaînes lourdes. Ce signal induit une prolifération aboutissant à la formation des cellules pré-B-II, qui sont plus petites que le pré-BI. Cette étape correspond à l'exclusion allélique : chaque locus des chaînes lourdes est réarrangé tour à tour, si le premier réarrangement est fonctionnel, l'expression des enzymes nécessaires au réarrangement est réprimée afin de ne pas réarranger le second locus. Au contraire, si le signal induit par ce premier BCR n'est pas suffisant, le second locus est réarrangé. Si le réarrangement n'est pas fonctionnel, la cellule est éliminée par apoptose. C'est une étape de sélection positive.

Une fois la sélection positive effectuée, le signal induit une prolifération cellulaire aboutissant au **pré-BII**. Cette signalisation implique diverses protéines de type kinase dont la tyrosine kinase de Bruton (Btk) qui, si elle est invalidée conduit à un arrêt de maturation au stade proB et pré-BI. Les cellules pré-BII perdent l'expression des  $\psi$ LC et du pré-BCR pour initier le réarrangement des chaînes légères : les allèles de la chaîne  $\kappa$  sont réarrangés tour à tour. Si le réarrangement des deux allèles  $\kappa$  n'est pas fonctionnel, les deux allèles de la chaîne  $\lambda$  seront réarrangés tout à tour. L'expression des chaînes légères, suite à un réarrangement fonctionnel, va permettre la formation d'un BCR complet, aboutissant à la formation d'un lymphocyte immature  $CD19+$  exprimant une immunoglobuline de surface complète de type IgM. Ce BCR va permettre une seconde sélection positive. En effet, les lymphocytes autoréactifs vont être éliminés par apoptose.<sup>36,37,40</sup>

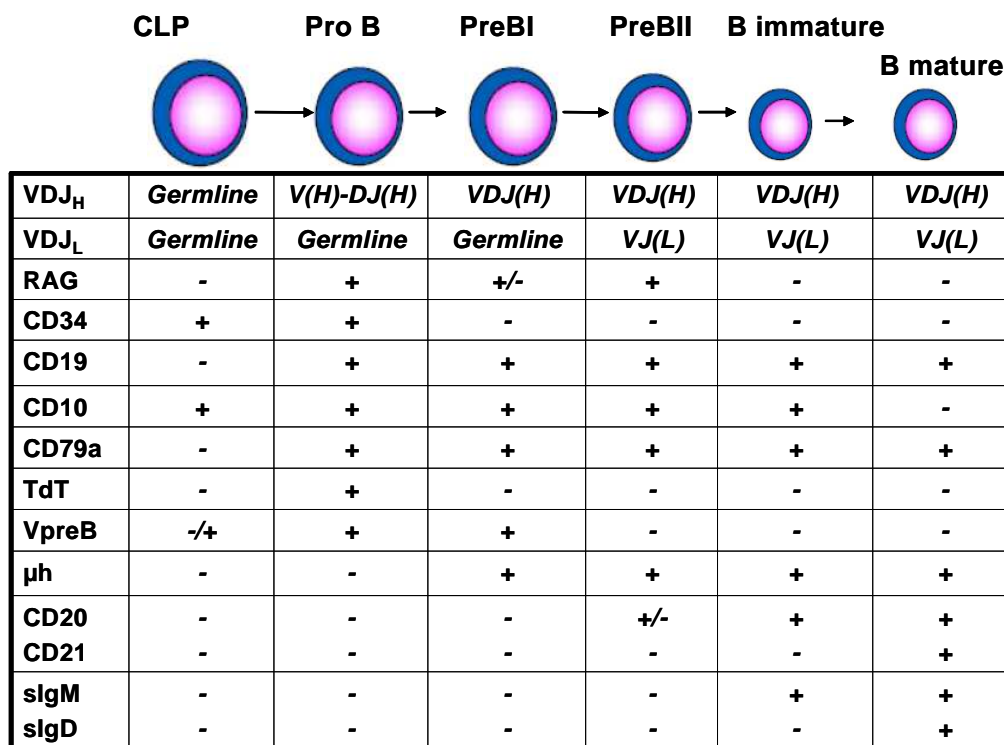


Figure 5 : Phénotype cellulaire au cours de la différenciation lymphocytaire B

## **C2 Régulation moléculaire (Figure 6)**

Le développement des lymphocytes B s'opère au sein de la moelle osseuse : les interactions des précurseurs B avec le microenvironnement médullaire y est important et permet la production de lymphocytes B tout au long de la vie. L'interaction avec les cellules stromales est réalisée par deux intégrines VLA-4 et VLA-5 qui toutes deux réagissent avec la fibronectine, VLA-4 interagit essentiellement avec VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1). L'interaction VCAM-1/VLA-4 est régulée par des cytokines : IL-1 $\beta$  et IL-4 augmentent l'expression de VCAM sur les cellules stromales alors que TGF $\beta$  la diminue. De plus, l'adhésion de VLA-4 à VCAM-1 nécessite au préalable l'interaction de SDF-1 (Stroma cell derived factor) avec le récepteur CXCR4 présent sur les précurseurs B. L'expression de CXCR4 est par ailleurs conditionnée par l'engagement vers la lignée lymphoïde : le précurseur B CD19<sup>+</sup> n'exprimant pas le CXCR4 possède encore une capacité de différenciation vers les cellules myéloïdes alors que son expression est corrélée avec un engagement plus restreint vers la lignée B<sup>41</sup>. Ces interactions avec le microenvironnement sont donc très importantes pour le développement des précurseurs hématopoïétiques.

Outre les interactions directes du stroma avec les cellules via SDF-1/CXCL12 et CXCR4, les cellules du stroma sont la source de nombreuses cytokines et facteurs de croissance nécessaires à la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Le rôle de l'IL-7 a souvent été sujet à controverse dans son implication dans la différenciation lymphocytaire B. Indispensable au modèle murin, la signalisation par l'IL-7R et Flt3 sont des éléments critiques au développement de cellules B. Flt3 permet de surexprimer IL-7R $\alpha$  ; la signalisation via IL-7R $\alpha$  permet d'exprimer en fait pax5, élément clé de l'engagement vers les cellules B. Le signal régulé par IL-7 au sein des cellules pré-B permet de promouvoir l'acétylation du locus *IGH* et favorise ainsi le réarrangement des chaînes lourdes<sup>42</sup>. Chez la souris, l'invalidation de la chaîne  $\gamma$ c commune à plusieurs récepteurs aux cytokines (IL-2, 4, 7, 9, 15, 21) conduit à un arrêt au stade pro-B avec défaut du réarrangement V-DJ<sub>H</sub>. L'absence de chaîne  $\gamma$ c aboutit à un syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (X-SCID). Chez l'homme, un défaut de la chaîne  $\gamma$  des récepteurs aux cytokines conduit certes à une immunodéficience constitutionnelle T mais le nombre de cellules B est normal voir augmenté. Chez la souris, le défaut d'expression d'IL-7 dans des souris KO montre un blocage de la lymphopoïèse B chez l'adulte mais pas dans la période néonatale ou fœtale. Ceci pourrait expliquer la différence observée de sensibilité à l'IL-7 entre des cellules B adulte murine et des cellules B fœtales humaines issus de sang de cordon. Enfin

deux éléments sont à prendre en compte : IL-7 murin est capable de stimuler l'IL-7R $\alpha$  humain et il existe une différence de sécrétion d'IL-7 entre des lignées cellulaires stromales murine S17 ou MS5 et des cellules stromales humaines : la capacité de synthèse de l'IL-7 est beaucoup plus importante par les cellules stromales murine (MS-5, S17) que par des cellules stromales humaines. De plus, la sensibilité à l'IL-7 au cours de la vie semble être variable : la quasi indépendance des cellules de sang de cordon à l'IL-7 n'est plus observée avec des progéniteurs humain de moelle osseuse adulte. (La réduction des cellules pro B issues de CSH adultes est de l'ordre de 50x comparée à celles issues de sang de cordon cultivées sur cellules stromales humaines pendant 3 semaines, mais la capacité à générer des cellules CD19<sup>+</sup> ne semble pas être altérée)<sup>43</sup>. FMS related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3) est un facteur de croissance sécrété par les cellules stromales ayant surtout une action potentialisante pour divers facteurs de croissance et interleukines mais sans réelle action de par lui-même. Le récepteur, Flt3/FLK2 fait partie du groupe III des tyrosine-kinases tout comme KIT ou PDGFR. Son rôle essentiel est de promouvoir la prolifération<sup>44,45</sup>.

Au niveau de la régulation moléculaire, trois facteurs de transcription sont majeurs dans la lymphopoïèse B : E2A, EBF-1 et pax5.

Parmi les cellules issues de progéniteur *ikzf1*<sup>-/-</sup>, l'expression d'EBF permet la génération de cellules de type pro-B. La réexpression d'Ikaros au sein de ces cellules pro B permet d'activer l'expression de gènes *Rag* mais aussi de réguler l'accès au locus *IGH*.<sup>46</sup> Aiolos, un autre membre des Kruppel-like Zinc finger transcription factor prend le relais d'Ikaros au cours de la différenciation B. Le KO d'Aiolos aboutit à un excès de progéniteurs B avec le développement d'autoanticorps et de lymphomes<sup>46</sup>.

**E2A** est un des facteurs qui agit le plus en amont dans la différenciation B. Le gène *tcfe2a* code pour 2 protéines E12 et E47 générées par un splicing alternatif au cours de l'épissage de l'ARNm. Ils se lient à une séquence consensus des protéines E. Ces protéines E appartiennent au groupe de protéines Hélice - Boucle- Hélice  $\beta$  (bHLH). Les protéines E et les protéines associées (E2-2 et HEB) s'associent en hétérodimères dans les différents tissus à l'exception du tissu lymphoïde où l'expression importante de E2A permet la formation d'homodimères. Ces protéines sont régulées par 4 autres protéines Id (pour inhibiteur de différenciation) qui séquestre les protéines E dans des hétérodimères incompetents. E2A fut initialement découvert dans la régulation du réarrangement des chaînes des immunoglobulines. E2A interagit avec le complexe SAGA<sup>47,48</sup>, un complexe protéique à activité acétyltransférase permettant de faciliter l'accessibilité au gène des immunoglobulines par modulation de la

chromatine. E2A est nécessaire à l'engagement vers la lignée B. Les souris  $E2A^{-/-}$  ont un blocage au stade proB sans initiation du réarrangement de la chaîne lourde<sup>49</sup> et n'exprime que faiblement EBF et n'exprime pas pax 5 : E2A agit en amont de pax5 et EBF. De même, la surexpression de protéines inhibitrices des protéines E, les protéines Id2 et Id3, bloque le développement au stade pro-B et induit leur apoptose<sup>50</sup>. Cet arrêt peut être outrepassé par l'expression d'une seule des 2 isoformes mais la présence des 2 isoformes permet une différenciation B normale<sup>51</sup>. Par couplage du promoteur de E2A avec le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein), l'expression de E2A est corrélée avec le début de l'initiation du réarrangement du gène *IgH* et cette expression perdure jusqu'à la fin du réarrangement des gènes *IgL*, parce que les gènes *Tdt* et *RAG* contiennent des séquences de régulation pour les E protéines.<sup>52</sup> L'assemblage d'un BCR fonctionnel permet de réprimer l'expression d'E2A puisque son expression est faible dans les lymphocytes matures de la moelle et du sang.

**EBF-1** est un facteur de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN distinct de ceux d'autres facteurs de transcription, notamment par son motif liant le zinc. Son principal rôle est la régulation épigénétique des gènes, par modification de l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcription. Son rôle est lié à la déméthylation des promoteurs de certains gènes. La surexpression d'EBF-1 dans une lignée plasmocytaire permet la réexpression de facteur comme CD79a et VpreB, des éléments du pré-BCR<sup>53</sup>. L'induction de l'expression d'EBF-1 est un événement critique pour le développement de la lignée B. Il est notamment dépendant d'E2A. Les souris n'exprimant pas EBF-1 n'expriment pas les éléments essentiels de la lignée B : CD79a, VpreB, et ne présente pas de réarrangement du locus *IGH*. Ce phénotype est similaire à celui des souris  $E2A^{-/-}$ . La proportion de cellules pro-B issue de souris  $E2A^{+/-}$   $EBF1^{+/-}$  est nettement diminuée, la différenciation y est plus altérée que chez les souris mutantes hétérozygotes pour un seul des 2 gènes<sup>39</sup>. Par ailleurs, elles n'expriment pas les transcrits RAG ou pax : ces arguments sont en faveur d'une coopération des 2 éléments pour l'expression de ces gènes. L'induction d'EBF1 au sein de CSH murine  $E2A^{-/-}$  permet la différenciation B mais ne permet pas l'expansion clonale initiale induite par IL-7.

L'expression EBF-1 est concomitante avec celle d'IL7R $\alpha$ , supposant une interaction entre ces 2 éléments au sein des cellules de souris. Des souris KO pour l'IL-7 exprime faiblement EBF-1 et ne peuvent pas développer de lignées B. D'ailleurs, le renforcement de l'expression de STAT5, médiateur du récepteur à l'IL-7 permet de retrouver l'expression normale d'EBF1.

Ebf1 est un gène contrôlé par 2 promoteurs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) induisant 2 protéines qui diffèrent de quelques AA. Il y a donc trois phases d'expression d'EBF1 :

- IL-7R recrute STAT5 qui en coopération avec E2A active *Ebfa* induisant l'expression d'EBF $\alpha$ .
- Celle-ci permet une auto-amplification et permet l'expression de pax5.
- L'expression de pax5 en collaboration avec PU.1 et Ets1 induit l'expression de EBF1 $\beta$ .

**Pax5 ou BSAP** (B cell specific activator protein) a été initialement identifié comme un élément interagissant au niveau de l'ADN des gènes *IGH* et *IGK*<sup>54</sup>. C'est une protéine interagissant avec la machinerie transcriptionnelle, notamment la TATA-binding protein, mais également avec des éléments de régulation épigénétiques, histone acétyltransférase ou histone déacétylase. L'absence d'expression de pax5 conduit à un arrêt de la différenciation B avec des cellules pro B puisqu'on y retrouve l'expression d'EBF1 et d'E2A. Mais ces cellules ne sont pas encore engagées dans la voie de différenciation lymphocytaire B puisqu'elles ont la capacité de générer des cellules NK, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules myéloïdes en fonction des cytokines auxquelles elles sont exposées ; Elles possèdent également une capacité d'autorenouvellement importante<sup>39</sup>. Ainsi les cellules déficientes en pax5 ne sont pas affiliées à des progéniteurs engagés dans la lignée lymphoïde B mais à des cellules progénitrices lymphoïdes exprimant un caractère myéloïde latent. La restauration de pax5 dans ces cellules restreint leur développement à la lignée B. L'expression de pax5 semble être maximale au moment de la transition vers le stade pré-B.

L'expression de pax5 en amont de ces stades ne permet pas d'engager des progéniteurs érythro-myéloïdes vers la lignée lymphocytaire B : pax 5 ne permet pas l'engagement vers la lignée lymphoïde B. Son effet est plutôt un effet promoteur de la lignée : il agit en aval de facteurs comme Ikaros, E2A et EBF-1. Il permet en fait d'adapter l'expression d'un programme génétique à la lignée B en favorisant l'expression de gène comme CD19, CD79a, CR2(CD21) et en réprimant des éléments impliqués dans la prolifération, comme *flt3*, ou impliqué dans l'ontogénie T comme *Notch1*, *TCR $\delta$*  et *CCR9*. Au final, l'expression de pax5 permet aux cellules engagées dans la lignée B d'être insensible aux signaux inappropriés à cette lignée<sup>54</sup>.

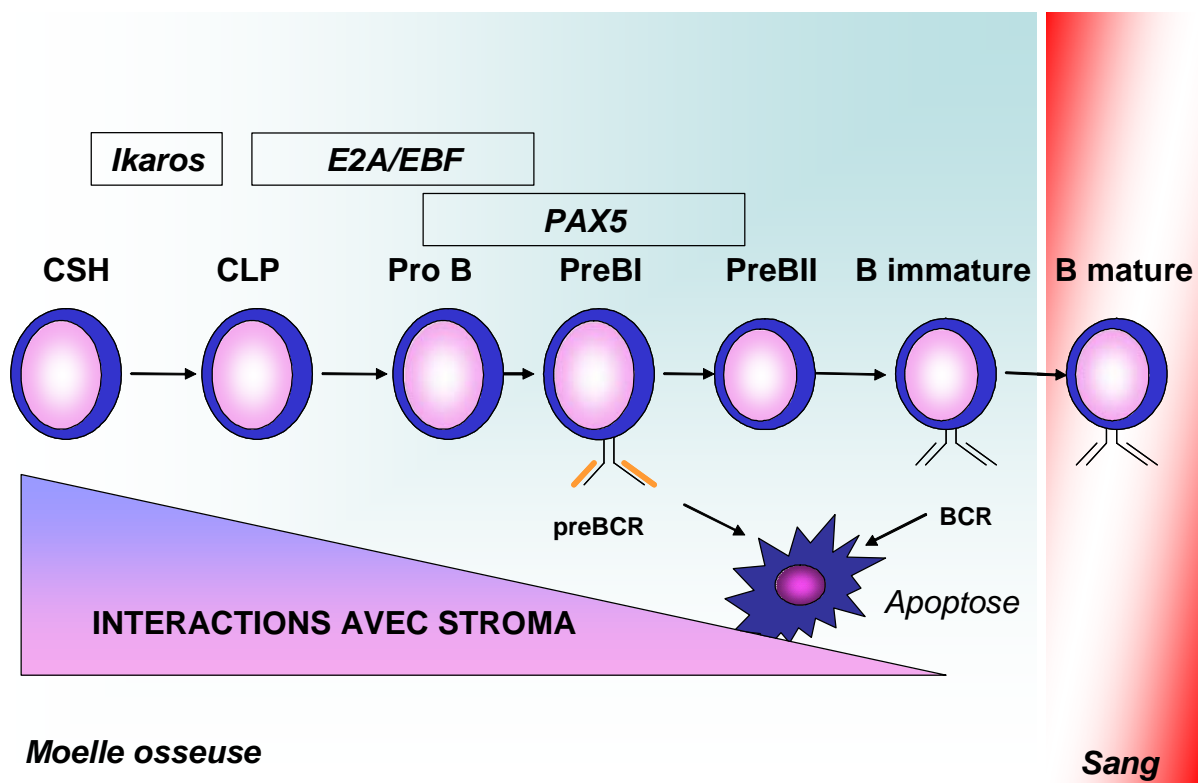


Figure 6 : Facteurs influençant la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse (D'après T Lebien, chap 76, Williams Hematology 7th<sup>55</sup>).

56

### **C3 Les sous-populations lymphocytaires.**

Parmi les sous populations B, il existe deux types de cellules B : les cellules à réponse T indépendantes( les lymphocytes B de la zone marginale et les lymphocytes B1), et les cellules à réponse T dépendantes (Lymphocytes B2). Les cellules matures de la moelle osseuse empruntent essentiellement une voie T dépendante. Ces cellules transitionnelles  $CD19^+CD24^{hi}CD27^+CD38^{hi}IgM^+IgD^-$  (équivalentes aux cellules du manteau) vont migrer vers la rate et les organes lymphoïdes secondaires pour y être éduqué, ou pour mourir. A côté d'une première vague de différenciation de lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'IgM à faible affinité, certaines cellules vont subir un processus de maturation des immunoglobulines par hypermutations somatiques, sous la dépendance des lymphocytes T. La coopération T-B, notamment par la voie du CD40-CD40L(CD154), aboutit si la cellule répond, à la migration au sein d'un follicule où elle va proliférer pour former la zone claire d'un centre germinatif, Les cellules sont des centroblastes. Le signal fournit par CD40 induit l'AID (activation induced deaminase), enzyme responsable des hypermutations somatiques des immunoglobulines. Les cellules migrent vers la zone sombre où elles apoptosent, sauf si le



BCR est suffisamment affin pour l'antigène. Ces cellules vont pouvoir déclencher le switch de classe d'immunoglobuline en coopération avec les lymphocytes T pour aboutir à la formation de plasmocytes à durée de vie courte  $CD19^{low}CD27^{+}CD138^{+}$  ou à des cellules mémoires  $CD19^{+}CD27^{+}IgM^{-}IgD^{-}$  (Elles sont  $IgA^{+}$  ou  $IgG^{+}$ ) ou  $IgM^{+}$  seule. Dans les syndromes Hyper-IgM liés aux mutations de CD154, ces cellules sont absentes du sang périphérique, l'interaction des lymphocytes B avec les lymphocytes T auxiliaires folliculaires au sein du centre germinatif nécessite une cosignalisation par le CD40<sup>56</sup>.

#### **D. Lymphocyte T<sup>57,58</sup>**

La genèse des lymphocytes T et leur différenciation intervient dans un organe (le thymus) différent de celui de l'expansion des progéniteurs (foie fœtal et moelle osseuse) ce qui implique une migration des cellules progénitrices de la moelle osseuse vers le thymus. Cet organe dont la taille s'accroît jusqu'à la puberté va involuer après l'adolescence sans qu'il n'y ait de conséquences sur les lymphocytes T. Son rôle est essentiel dans la bonne différenciation des progéniteurs lymphoïdes en lymphocytes T en période fœtale et au cours de l'enfance. L'absence de thymus à la naissance (syndrome de Di-George, thymectomie) conduit à un déficit immunitaire profond. L'activité thymique est maximale durant la période foetale et les premières années de la vie. Son activité de production, qui peut être étudié par l'étude des segments d'excision issus du réarrangement des chaînes du TCR (TREC), montre une activité cinq fois moindre à 35 ans et 50 fois moindre à 65 ans.<sup>59</sup>

#### **D1 Des progéniteurs lymphoïdes vers la colonisation du thymus.**

L'appartenance à la lignée lymphocytaire T se définit par l'expression du CD3, complexe moléculaire associé au TCR. Le CD7 est un marqueur présent tout au long de la différenciation T, mais il n'est pas spécifique (il est présent sur quelques cellules myéloïdes et NK).

Les progéniteurs des lymphocytes T ne se développent pas au sein de la moelle osseuse comme les lymphocytes B. Il n'a pas été mis en évidence dans la moelle osseuse un progéniteur ayant uniquement une capacité de générer des cellules T. Cela suppose donc que les progéniteurs lymphocytaires migrent vers le thymus afin de s'y développer. Il n'existe pas de consensus sur les cellules qui migrent vers le thymus. Selon *Six et al*, au sein de la population  $CD34^{+}CD10^{+}CD19^{-}$ , il existe une population  $CD24^{-}$  exprimant IL-7R $\alpha$ , TdT,

RAG, Pax5 et cCD3. La population CD24<sup>+</sup> est restreinte au lymphocyte B. Ces cellules CD24<sup>-</sup> sont présentes dans le sang et le thymus<sup>57,60</sup>. Des cellules CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>, non présentes dans le foie fœtal émergent de la moelle osseuse fœtale avec un pic au cours du second trimestre de gestation. Une partie de cette population cellulaire exprime le CD2, une partie du complexe CD3 et 1/3 des cellules expriment CCR9 (CCL25 récepteur) et CXCR4, récepteurs également impliqués dans la colonisation thymique. Enfin elles expriment fortement le c-kit (CD117) mais pas Flt3 (CD135)<sup>31,61</sup>. Ces cellules ont un fort potentiel NK en comparaison des cellules CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>. La culture de ces cellules sur cellules stromales OP9-hdelta1 (lignée cellulaire de stroma médullaire transfecté pour exprimer le ligand delta1 des récepteurs Notch1) induit l'expression de CD1a et l'apparition de CD7 et CD5<sup>60</sup>. Ces cellules (CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>) vont ensuite devoir migrer vers le thymus (ces cellules sont présentes dans le thymus dans la population CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>). Au final, il semble que les progéniteurs ne soient pas tous engagés vers les cellules T avant la migration au sein du thymus.

La colonisation thymique n'est pas un événement continu<sup>60</sup>, elle semble se faire par des vagues successives :

- L'une avant l'apparition de la vascularisation thymique, au moment où il existe une expansion des cellules épithéliales thymiques (avant la 8<sup>ème</sup> semaine de gestation). Les cellules T se développent par contiguïté entre le tissu hématopoïétique fœtal mésodermique et le tissu thymique neuro-ectodermique.
- L'autre une fois la vascularisation établie lorsque les différentes régions du thymus sont bien développées. (Cette migration semble être potentiellement organisée par des chimiokines CCR9/CCL25 chez la souris). Les cellules immigrantes vont entrer au niveau de la jonction cortico-médullaire.

### **D2 Différenciation intra-thymique<sup>58,61,62</sup> (Figure 7)**

Le thymus est composé de structures anatomiques définies : le cortex périphérique et la medulla centrale. Les cellules immigrantes vont entrer au niveau de la jonction cortico-médullaire, traverser le cortex jusqu'à la capsule puis redescendre dans la medulla.

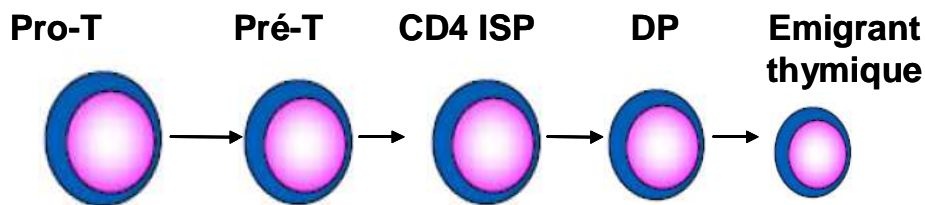
Au cours de la différenciation, les précurseurs thymiques vont migrer à travers le cortex vers la capsule : les cellules immatures double-négatives (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) vont s'y différencier en

cellules double-positives et vont subir la sélection  $\beta$ . Elles migrent au sein de la medulla pour terminer la différenciation et subir le processus d'éducation et de sélection négative et positive.

Au cours de cette différenciation, l'éducation du récepteur des cellules T (TCR) va être réalisée. Le TCR est un récepteur dimérique encodé par différents segments V-D-J de gènes qui vont être réarrangé par la même machinerie enzymatique que les immunoglobulines, les enzymes RAG. Le réarrangement va s'opérer sur les TCR  $\gamma$  puis  $\delta$ , et enfin  $\beta$  et  $\alpha$ . Ce récepteur est associé à un complexe de signalisation CD3 composé de 5 chaînes :  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon(x2)$ , et un dimère composé des chaînes  $\zeta$  ou  $\eta$ . Le complexe CD3 est le support des domaines permettant de déclencher la signalisation cellulaire.

La première population humaine thymique, la plus immature correspond à une cellule **CD34<sup>+</sup>CD38<sup>lo</sup>CD1a<sup>-</sup>**. Cette population n'est pas encore totalement engagée dans la voie T puisqu'elle peut donner des cellules dendritiques, NK, B et myéloïdes<sup>32,61,63,64</sup>. Cette population co-exprime le CD7, le CD2, le cCD3. Elle exprime également le CD45RA et faiblement le CD117 (CD117<sup>low</sup>). Cette population est composée de cellules **pro-T**. Le réarrangement  $\delta$  débute dans ces cellules et sera majoritaire au cours de la transition CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> vers CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>. L'acquisition par la suite de CD1a marque l'engagement vers la lignée T avec la perte des autres potentiels de différenciation. Ce stade est défini comme stade **pré-T**. Ces cellules réarrangent les chaînes TCR  $\gamma$  et  $\beta$ . Une fois les deux premières chaînes réarrangées ( $\delta, \gamma$ ), le réarrangement de la chaîne  $\beta$  commence sous dépendance de l'IL-7. Les cellules perdent l'expression du CD45RA au profit de l'expression du CD45RO qu'elles conserveront jusqu'à la formation de lymphocytes T naïfs matures. La population suivante est une **population de cellules simple-positives immature CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>(CD4ISP)**. C'est au sein de cette population que le réarrangement de la chaîne  $\beta$  a lieu et que s'initie la sélection  $\beta$ . C'est le mécanisme par lequel les précurseurs T ayant réalisé un réarrangement productif de la chaîne  $\beta$  sont sélectionnés pour se différencier en lymphocytes  $\alpha\beta$ . Ce mécanisme débute dans les cellules CD4ISP et continue parmi les cellules **double-positives CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>**. La chaîne  $\beta$  est associée à une pseudo-chaîne  $\alpha$  : chaîne  $\alpha$  pré-TCR (pT $\alpha$ )<sup>62</sup>. Ce pré-TCR va permettre la sélection  $\beta$  et l'exclusion allélique. Si le réarrangement  $\beta$  n'est pas fonctionnel, la cellule peut, soit se différencier en cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T $\gamma\delta$  si les réarrangements  $\gamma$  et  $\delta$  sont fonctionnels et ainsi quitter le thymus en direction des muqueuses, soit entrer en apoptose si les réarrangements  $\gamma\delta$  ne sont pas

fonctionnels. A noter que si le réarrangement  $\beta$  est fonctionnel, le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  va « détruire » celui de la chaîne  $\delta$  (le gène de la chaîne  $\delta$  est situé entre les régions V et J de la chaîne  $\alpha$ ). Elle donne naissance à la population double positif ( $CD4^+/CD8^+/CD3^{low}$ ) qui existe en deux stades en fonction de l'expression des chaînes  $\beta$  de CD8 : les cellules  $CD4^+CD8\alpha^+\beta^-CD3^{low}$  (Double positif précoce EDP) et celles  $CD4^+CD8\alpha^+\beta^+CD3^{lo}$  (DP tardif ). Ces deux stades précèdent l'expression de CD3.



DJ TCR	$\delta$	$\gamma > \beta$	$\beta$	$\alpha$	
RAG	-	+	+/-	+	-
CD34	+	+	-	-	-
CD1a	-	+	+	+	+
CD7	+	+	+	+	+
CD4	-	-	+	+	+ ou -
CD8	-	-	-	+	- ou +
CD45RA	+	-	-	-	+
CD3	-	-	-	+	+

Figure 7: Tableau récapitulatif de la différenciation T au sein du thymus

Après avoir réarrangé la chaîne  $\alpha$  du TCR, les cellules  $\alpha\beta$  vont s'engager vers une apoptose, à moins qu'elles puissent reconnaître avec une faible affinité des peptides du soi couplés aux molécules HLA (mécanisme de la sélection positive). Après la sélection positive, les cellules vont exprimer fortement, le CD69. Les cellules présentant par la suite une trop forte affinité vont être également détruites (sélection négative). Après la sélection positive, les cellules DP se différencient en cellules simple positives SP  $CD3^+CD4^+$  ou  $CD4^+CD8^+$ . A travers différentes étapes transitionnelles, les cellules vont perdre l'expression de CD69 et CD45R0 au profit de CD62L et CD45RA, phénotype correspondant à la population lymphoïde T naïve. Les émigrants thymiques récents, c'est-à-dire ceux n'ayant pas encore subi de division, exprime le CD31 pour les cellules  $CD4^+$  et le CD103 pour les  $CD8^+$ . Ces marqueurs ont été corrélés avec des cellules simples positives riches en TREC. Les TREC, segments d'excision issus du réarrangement des chaînes du TCR, sont des fragments d'ADN

circulaire présents dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La richesse en TREC est associée à une émigration récente du thymus<sup>65,66</sup>. La quantité de TREC est diluée dans la cellule au fur et à mesure de ses divisions.

### **D3 Régulation moléculaire**

CXCR4, récepteur au SDF1 (ou CXCL12) est également un facteur important dans le développement lymphocytaire T, notamment dans la sortie des lymphocytes T naïf du thymus. Les mutations de CXCR4, aboutissent au syndrome de WHIM (Verrues [Warts], hypogammaglobulinémie, Infection, Myelokathexis[neutropénie/moelle hyperplasique]), un déficit immunitaire avec déficit en polynucléaires, hypogammaglobulinémie et lymphopénie T. La lymphopénie est probablement liée à un déficit d'export des lymphocytes T naïfs du thymus<sup>67</sup>.

L'interleukine 7 est une cytokine clé du développement des lymphocytes T. Les déficits en IL-7R $\alpha$ , IL-7, ou en protéines de la voie de signalisation de ce récepteur comme la kinase Janus 3, aboutissent à un déficit immunitaire commun sévère touchant la lignée T et NK (sauf pour les déficits en IL-7R $\alpha$  où il n'y a qu'un déficit T). Dans un système artificiel d'organoculture, le développement T est bloqué lors de la transition pré-T vers CD4ISP en présence d'anticorps anti-IL-7R<sup>68,69</sup>.

La différenciation lymphocytaire est liée essentiellement à la voie Notch, aux protéines E et à GATA-3.

L'expression de ces facteurs nécessite des signaux de l'environnement. Pour la différenciation T, les ligands du récepteur Notch occupent une voie essentielle. L'invalidation du gène Notch1 provoque l'inhibition du développement T dans le thymus<sup>70</sup>. A la différence, une forme active de Notch permet d'imposer un développement T aux précurseurs hématopoïétiques<sup>71,72</sup>. Par ailleurs, le signal Notch est précoce, il est essentiellement localisé à la jonction cortico-médullaire du thymus mature, qui correspond au lieu d'entrée des précurseurs hématopoïétiques<sup>73</sup>.

Il existe 4 récepteurs Notch (Notch1-4) et 5 ligands (Jagged1, 2 et delta-like 1, 2, 3). L'interaction récepteur-ligand va induire une protéolyse, libérant ainsi un fragment intracytoplasmique qui permet au facteur de transcription RBPJ (recombinaison site binding protein J), de passer d'un statut répresseur à un statut activateur.

Le signal Notch est très fort au sein du thymus, orientant ainsi les cellules vers la lignée lymphocytaire T et en réprimant la différenciation vers la lignée lymphocytaire B (par inhibition de EBF<sup>74</sup>) et myéloïde. Dans la moelle osseuse, le signal Notch est faible, il ne peut pas promouvoir la différenciation lymphocytaire T mais ne peut pas inhiber la différenciation B. L'interaction Notch1 avec delta-1 est essentielle aux stades précoces : pré-T et immature SP mais décroît à partir du stade double positif.

Cependant, la surexpression d'Id2 dans un système d'organoculture (FTOC) permet de faire dévier ces cellules vers un engagement NK.<sup>75</sup> Donc, Notch ne détermine pas l'engagement T mais permet de le favoriser au dépend des autres lignées.

L'expression de pax5 dans la moelle osseuse réprime l'expression de Notch1 dans les progéniteurs B et favorise ainsi la différenciation B. Par contre, la présence d'un signal Notch sur des cellules pro-B issues de souris pax5<sup>-/-</sup> permet de développer des cellules NK<sup>76</sup>.

GATA-3 est aussi un gène important dans le développement T. L'invalidation du gène chez des souris aboutit à un blocage précoce de la thymopoïèse avant la sélection  $\beta$ <sup>77</sup>. Au sein d'un système d'organoculture avec des cellules CD34<sup>+</sup> issus de thymus, la surexpression de GATA-3 interfère avec le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR. Cependant, la conversion vers un lignage myéloïde des thymocytes induits par C/EBP $\alpha$  ou PU.1 est inhibée par la co-expression de GATA-3<sup>78</sup>. Par ailleurs, GATA-3 est un des gènes induit par la signalisation de Notch dans l'orientation Th2 des lymphocytes T CD4<sup>+79</sup>

Le développement des cellules T est un système complexe qui dépend d'un équilibre entre différents facteurs, notamment les protéines E, GATA-3 et Notch.

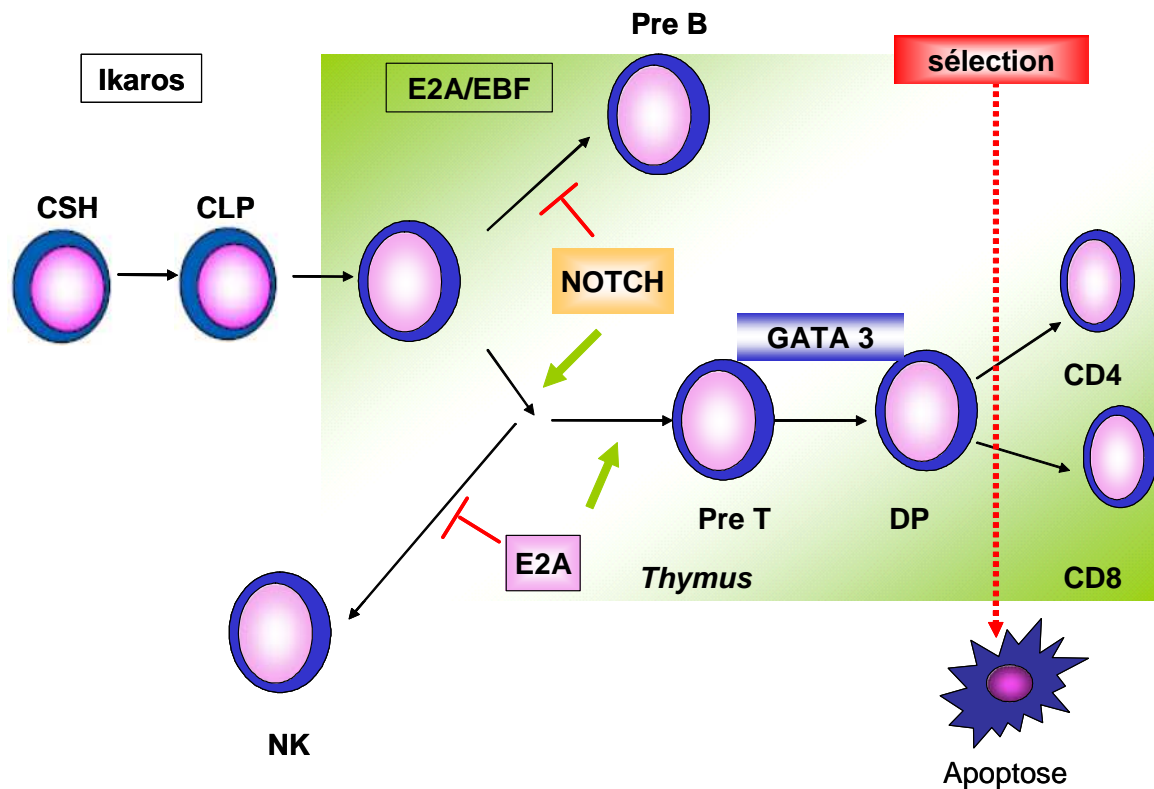


Figure 8 : Facteurs de transcription au cours de la différenciation T

#### D4 Les sous populations lymphocytaires T<sup>80,81</sup>

Dans le sang, deux populations de lymphocytes T coexistent : d'une part, les lymphocytes auxiliaires CD4<sup>+</sup>, d'autre part les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. Parmi les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, on connaît essentiellement les T<sub>H</sub>1 et les T<sub>H</sub>2, deux populations reconnues respectivement pour l'orientation de la réponse immunitaire vers une réponse ciblant les infections intracellulaires ou extracellulaires. Ces populations ne sont malheureusement discriminable que par le profil de sécrétion de cytokines : l'interféron  $\gamma$  pour les T<sub>H</sub>1 ou l'IL-4 pour le T<sub>H</sub>2. Outre cette différenciation, il existe au sein des cellules CD4<sup>+</sup> différentes sous-populations : des cellules naïves, des cellules effectrices et des cellules mémoires.

La distinction parmi ces sous populations en cytométrie de flux est possible par l'utilisation de 3 marqueurs, l'isoforme RA du CD45, l'expression du récepteur CCR7, un récepteur à chemokine impliqué dans la domiciliation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et une L-selectine CD62L impliquée dans le passage au travers de l'endothélium. Ainsi, on distingue les cellules naïves CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62<sup>hi</sup>CCR7<sup>+</sup>, les cellules mémoires centrales (ganglionnaires) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62<sup>hi/lo</sup>CCR7<sup>+</sup> qui peuvent proliférer suite à une activation par les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules effectrices mémoires CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>CD62<sup>hi/lo</sup>CCR7<sup>-</sup> qui sont des cellules effectrices *ex*

*in vivo*. Ainsi l'expression de CD45RA ou CD45RO est une approche rapide de la présence de cellules naïves ou mémoires mais cette approche est incomplète. Pour les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, l'expression de CD45RA, CCR7 et CD62L distingue trois populations : les cellules naïves CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62<sup>hi</sup>CCR7<sup>+</sup>, les cellules mémoires centrales CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62<sup>hi/lo</sup>CCR7<sup>+</sup> et les cellules mémoires effectrices CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>CD62<sup>lo</sup>CCR7<sup>-</sup>. La définition de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peut également se faire par l'expression de CD11a. Une faible expression est associée avec un caractère naïf alors qu'une forte expression est associée avec un caractère mémoire ou effecteur.<sup>80,81</sup>

Parmi ces cellules, on peut observer des cellules activées qui expriment le CD25 (correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2). Au sein des populations circulantes, on peut identifier parmi les cellules CD4<sup>+</sup> une population CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Elles peuvent être également caractérisées par le marquage CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> (CD127=IL7R $\alpha$ ). Cette population qui possède un TCR de haute affinité pour les antigènes du soi n'est pas éliminée par apoptose au moment de la sélection négative intrathymique, elle se différencie en cellules T régulatrices. Ces cellules ont un profil cytokinique particulier, elles sécrètent de l'IL-10 et du TGF $\beta$ , deux cytokines aux capacités inhibitrices sur la réaction immunitaire. Pendant longtemps, la recherche des ces cellules par la seule expression forte du CD25 sur les cellules CD4<sup>+</sup> a aboutit à des résultats discordants. Cependant, la découverte de foxP3, un facteur de transcription (marquage intracellulaire en cytométrie de flux), a permis de mieux appréhender ces cellules. De nombreuses équipes travaillent sur cette population cellulaire car elle est impliquée dans des mécanismes de tolérance immunologique (greffe de sang de cordon). Par ailleurs, l'emploi de lymphocytes T régulateurs issus de culture *in vitro* pourrait devenir un outil thérapeutique de la GvH voire des maladies auto-immunes.

A noter, qu'il existe une population CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, dénommé cellules NKT. Ces cellules expriment un TCR invariant caractéristique composée d'une unique chaîne  $\alpha$  V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 et d'un répertoire de la chaîne  $\beta$  biaisé souvent restreint à la chaîne  $\beta$ 11.

### **E. Lymphocyte NK<sup>82,83</sup>**

Les lymphocytes NK (*ou Natural Killer*) sont de grands lymphocytes à grains et correspondent à la troisième sous-population lymphocytaire. Ce sont des cellules immunitaires appartenant à la fois à l'immunité innée et acquise. Leur rôle est double : ils possèdent une action cytolytique (par le système perforine-granzyme ou par la voie Fas/FasL)



vis-à-vis des cellules hôtes en cours de transformation maligne ou infectées par un élément pathogène, et une action de régulation des autres compartiments cellulaires par la sécrétion de cytokines, notamment l'interféron- $\gamma$  qui va favoriser la présentation cellulaire des molécules du CMH de type I et la présentation d'antigène par les cellules dendritiques.

Les lymphocytes NK et leurs précurseurs sont a priori des cellules de la moelle osseuse. *In vitro*, ces cellules ne nécessitent pas de stroma pour se différencier. Néanmoins, il n'est pas exclu que la différenciation terminale des lymphocytes NK nécessite une maturation dans un tissu périphérique.<sup>83</sup>

Dans le sang, il existe deux sous-populations NK définies par l'expression des marqueurs CD16 (Fc $\gamma$ RIII) et CD56

- Une population majoritaire CD16<sup>+/-</sup>CD56<sup>bright</sup> (90%) possédant des fonctions cytotoxiques (majoritaires dans la moelle osseuse)
- Une population CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> possédant essentiellement des fonctions sécrétrices de cytokines (mais population NK majoritaire dans les organes lymphoïdes secondaires).

La plupart des données concernant le développement des cellules NK provient d'analyse *ex vivo* de cellules CD34<sup>+</sup> différenciées en culture *in vitro*.

A partir des cellules progénitrices, le développement des cellules NK va essentiellement être coordonné par deux interleukines, IL-2 et l'IL-15. Ces molécules permettent d'induire un signal de différenciation via leur récepteur spécifique. Les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 partagent la chaîne  $\gamma_c$  des récepteurs aux IL-2, 7, 9, 15 et 21. L'absence de cette chaîne  $\gamma_c$ , décrite dans les déficits immunitaires communs variables sévères liés à l'X, conduit à l'absence de développement de lymphocytes T et NK.<sup>42</sup>

### **E1 Aspect phénotypique**

Une population pré-NK a pu être identifiée au sein des progéniteurs CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> présent dans la moelle osseuse, population également très présente dans les organes lymphoïdes secondaires, où cette population est en contact avec des cellules présentatrices de l'antigène exprimant à leur membrane de l'IL-15. Récemment, *Freud et al* ont pu identifier 4 stades de développement NK au sein d'organes lymphoïdes secondaires définies par cytométrie de flux par l'expression de CD34, CD117 et CD94/NKG2A (figure 9).

Le premier stade de développement NK (**pro NK** : CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>CD94<sup>-</sup>) n'est pas sensible à l'IL-15. Elle exprime le CD33. Cependant, une stimulation par Flt3, IL-3 et IL-7 permet à une fraction de ces cellules de passer au stade suivant (**pré NK** : CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>) qui est sensible à l'IL-15. Cette population commence à exprimer le CD56. Cette seconde population est capable de se différencier vers le stade suivant sans être stimulée par une autre cytokine que l'IL-15 (ou IL-2) mais conserve une plasticité vers la lignée dendritiques *in vitro*. Le passage au **stade immature NK** (CD34<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>CD117<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>) restreint le potentiel *in vitro* uniquement à la lignée NK. Elle perd l'ensemble des marqueurs des autres lignées pouvant être présents auparavant comme le CD123 (IL-3R) ou le CD33. Ces cellules sont encore incapables de produire de l'interféron  $\gamma$  ou d'avoir une activité de cytolyse, notamment par le manque d'expression des récepteurs spécifiques des cellules NK comme CD94/NKG2A ou les récepteurs KIR (killer immunoglobulin-like receptor). Le stade fonctionnel (CD34<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>CD117<sup>-</sup>CD94<sup>+</sup>) est caractérisé par l'acquisition de CD94/NKG2A, permettant de générer une inhibition dépendante du CMH de type I, par l'expression forte de CD56 et la perte d'expression de CD117 et CD33. Ces cellules peuvent avoir une activité cytolytique induite par le système Fas/FasL ou via la perforine. Par ailleurs, ces cellules expriment des marqueurs comme CCR7, CXCR3 ou CD62L, médiateurs impliqués dans la domiciliation dans les organes lymphoïdes secondaires. Enfin, il semblerait que la sous-population CD56<sup>bright</sup> soit un stade immature de la population CD56<sup>dim</sup> : l'activation des cellules CD56<sup>bright</sup> permettrait une expression intense des récepteurs associés aux cellules NK, expression caractéristique de la cellule CD56<sup>dim</sup>.

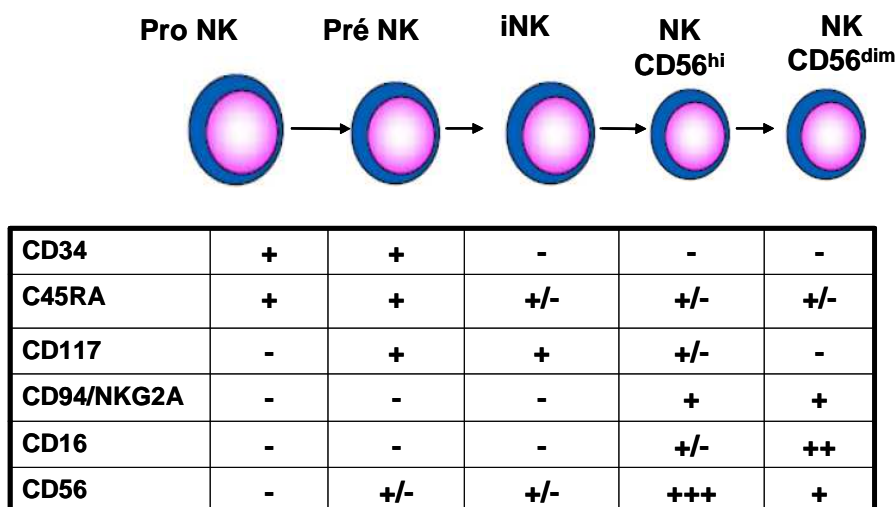


Figure 9: Aspect phénotypique de la différenciation NK.

## **E2 Régulation moléculaire**

Parmi les cytokines, l'IL-15 est une cytokine clé du développement NK. Un déficit en IL-15 ou de son récepteur chez la souris induit un déficit plus profond qu'en cas d'absence d'IL-2 ou d'IL-7. Cependant, ces deux dernières cytokines sont importantes, notamment l'IL-2, puisque les précurseurs NK (Pré-NK à NK CD56<sup>bright</sup>) expriment le récepteur de l'IL-2 de haute affinité. De plus, l'activité de l'IL-15 nécessite la présence de CD122 (IL2R $\beta$ ) sur la membrane des précurseurs alors que celui-ci n'est détecté que vers les stades terminaux, à la différence de CD127 (IL-7R $\alpha$ ) ou de CD117(c-kit) exprimé de manière plus précoce.

Parmi les facteurs de transcription important, il semble que l'expression d'Ets-1 augmente avec l'engagement vers la lignée NK. Les souris *Ets-1*<sup>-/-</sup> présentent un déficit quantitatif en NK. Les cellules NK présentent par ailleurs des défauts de fonctionnalité.

GATA-3 semble favoriser l'engagement vers la lignée NK, son expression augmente des stades précoces à immatures et diminue au sein des stades matures à la différence de T-BET (facteur de transcription régulant l'expression de l'interféron  $\gamma$ ) qui lui n'est détectable qu'à partir des stades matures.

## **VI.Reconstitution immunitaire post allogreffe**

La reconstitution immunitaire est un élément important dans le suivi postgreffe : non seulement, il importe beaucoup parce qu'on place le patient dans une situation d'immunodépression intense, mais aussi parce qu'on maintient cette immunodépression afin de prévenir la GvH, ce qui accroît le risque d'infection. L'ensemble de ces paramètres (immunosuppression, immunomodulation, infection) sont des critères importants dans reconstitution immunitaire du patient.

Après la réalisation de la greffe (conditionnement, injection des cellules), les premiers éléments qui réapparaissent sont les polynucléaires (18 à 30j). Durant les trois premiers mois vont réapparaître les cellules NK. Elles sont suivies par les cellules lymphocytaires T cytotoxiques (CD8) au cours de trois premiers mois, puis par les T auxiliaires (CD4) dans les trois à six mois suivant la greffe. Enfin, les lymphocytes B réapparaissent entre 3 mois et 1 an avec un retour des immunoglobulines M et G à la normale entre trois et six mois, et des Immunoglobulines A vers 1 an. Par ailleurs, la première sous-population B à réapparaître est une sous-population CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (dans les 15 premiers jours post allogreffe)<sup>84,85</sup>.

Cette cinétique de reconstitution est corrélée avec une cinétique de développement possible d'infection opportuniste (Figure 9). Cette reconstitution permet également d'arrêter certains traitements prophylactiques et de débiter un programme vaccinal.

Au cours la phase de déplétion des polynucléaires, le patient est à haut risque de développement d'infections bactériennes (bactéries encapsulées) et fongiques (*Aspergillus sp*, *Candida sp*). Cette période est associée à une période de 4 mois de risque d'infections ou de réactivations virales, notamment des virus de la famille des herpesviridae, avec notamment des réactivations herpétiques (*Herpes Simplex Virus*), des réapparitions de zona (*Varicella Zona Virus*) ou des pneumopathies à *Cytomégalo*virus et des lymphomes EBV induits suite à une infection à *Epstein Barr Virus*. Cette famille virale est problématique car la population caucasienne présente une importante séroprévalence. La reconstitution rapide d'une immunité cellulaire cytotoxique (cellules NK et lymphocytes T CD8+) est un facteur limitant à ce risque. L'un des problèmes du médecin greffeur repose sur la gestion de l'immunosuppression du patient pendant la première année de la greffe. En effet, il doit être en mesure de pouvoir trouver un équilibre permettant une immunodépression suffisante afin de limiter au mieux la GvH mais doit également laisser une activité à l'immunité cellulaire innée et acquise afin de pouvoir exercer un contrôle anti infectieux.

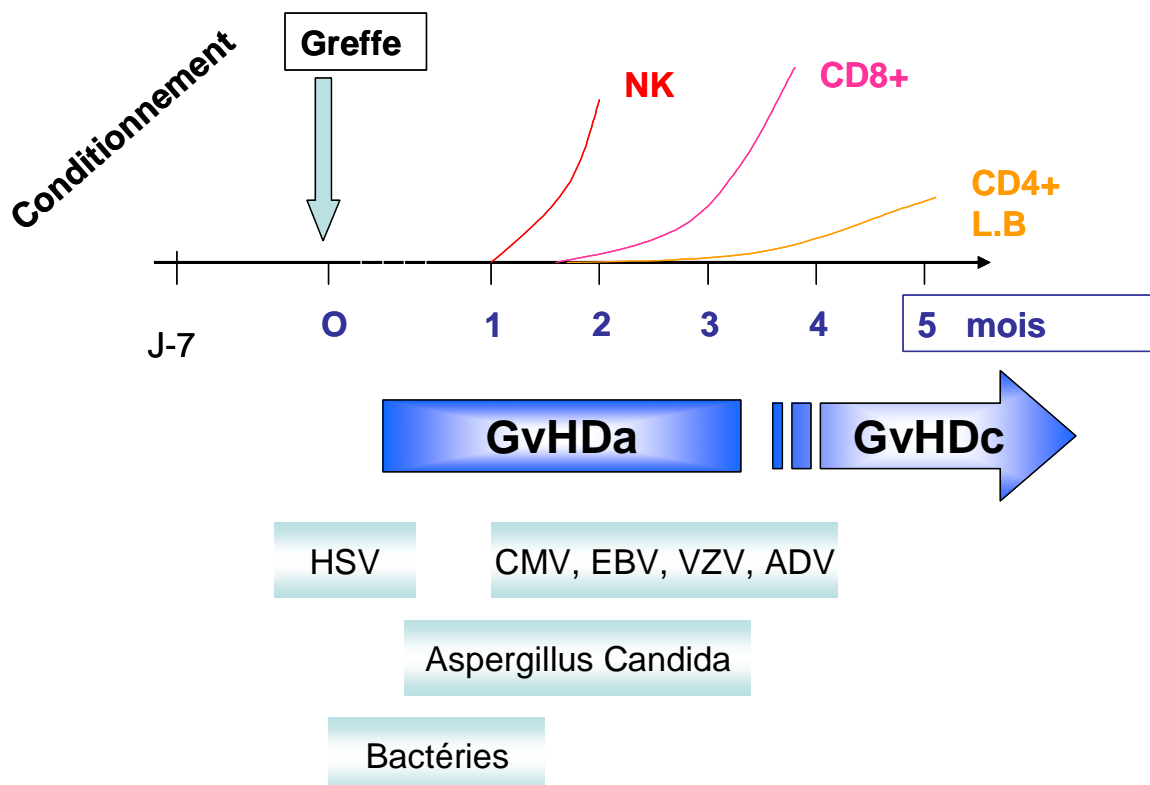


Figure 10: Cinétique de la reconstitution immunitaire au cours de la greffe et du risque infectieux concomitant à l'immunodépression (D'après Revillard)<sup>86</sup>

Par ailleurs, la susceptibilité aux infections liée aux déficits T et B est une cause de morbidité et de mortalité importante. Plus de 80% des patients ont au moins une infection dans les deux années qui suivent l'allogreffe (en excluant les infections hautes de l'arbre respiratoire) et 50% en ont au moins trois<sup>87</sup>. C'est le facteur principal de mortalité post allogreffe chez le patient sans rechute. Cette période peut durer plus d'an. La génération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut être altérée jusque vingt ans après transplantation.<sup>88</sup>

## **A. Techniques employées pour le suivi de la greffe**

### **A1 Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technique d'analyse permettant d'étudier des particules en suspensions à l'échelle individuelle. En effet, l'échantillon prélevé par le cytomètre a une tendance naturelle à se répartir dans un système tridimensionnel. Le système fluidique du cytomètre va permettre de réorganiser ce système afin de faire passer les particules de l'échantillon une à une. Ainsi, on peut analyser dans notre cas des cellules en suspension à l'échelle de la cellule. L'analyse simple d'une cellule en cytométrie est basée sur deux propriétés optiques : la lumière diffusée issue d'une source monochromatique (laser) traverse différents éléments de la cellule de densité optique différente. La lumière diffusée par ces éléments cellulaires est mesurée par des cellules photovoltaïques situées derrière l'échantillon. La mesure dite à petit angle correspond à la diffusion de la lumière par les parois membranaires de la cellule. Cette mesure, habituellement dénommée Forward Scatter (FSC) est corrélée à la taille de l'échantillon. Une mesure dite à grand angle ou Side Scatter (SSC), correspond à la lumière diffusée par le contenu cellulaire. Elle est assimilée à la granulosité (contenu) cellulaire. Cette analyse permet dans le sang (après lyse érythrocytaire) de différencier trois populations. Les cellules FSC<sup>low</sup>SSC<sup>low</sup> correspondant aux lymphocytes, des cellules FSC<sup>high</sup>SSC<sup>low</sup> correspondant aux cellules monocytaires, et des cellules FSC<sup>high</sup>SSC<sup>high</sup> correspondant aux polynucléaires.

A ce système optique, un second système optique composé d'un ou plusieurs lasers (émettant à des longueurs d'onde différentes), de 4 (ou plus) miroirs dichroïques et cellules photovoltaïques permet d'étudier à l'aide de molécules fluorescentes des éléments cellulaires marqués par des fluorochromes. Le principe repose sur l'excitation de fluorochromes différents par une longueur d'onde quasi identique (ce qui permet de limiter le nombre de

sources lumineuses et les interférences).Après excitation, ils réémettent l'énergie absorbée sous forme de photons à une longueur d'onde différente de celle de source d'excitation et à des longueurs d'onde différentes entre les différents fluorochromes. Cela permet, à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques couplés à différents fluorochromes, d'étudier des marqueurs de surface cellulaire ou des marqueurs intracellulaires (après avoir perméabilisé la membrane cellulaire). Cette analyse permet à la fois un aspect qualitatif (présence du marqueur recherché ou non) et quantitatif (l'intensité de la fluorescence reflète la densité du marqueur étudié sur sa cible). Elle permet donc d'évaluer les différentes populations présentes dans le sang, la moelle osseuse, ou un tissu après broyage.

Dans le cadre de l'étude de la reconstitution immunitaire, la cytométrie de flux est utile pour différencier les différentes sous population lymphocytaires : B, T, NK essentiellement

- Les lymphocytes B expriment des marqueurs pan lymphocytaire B CD19, le CD20, une immunoglobuline de surface (sIg). L'ajout de l'expression des IgD, IgM, CD38, CD24, CD27, CD5, CD43 permet de différencier les lymphocytes B1 et B2, les lymphocytes naïfs, mémoires, activés et transitionnels. L'ajout de CD138 permet également de distinguer les plasmocytes.
- Les lymphocytes T expriment comme marqueur commun le CD3. On distingue la population de lymphocytes auxiliaires (helper) exprimant le CD4 de la population lymphocytes cytotoxiques CD8. On peut combiner ces marquages avec ceux des isoformes RA ou RO du CD45 : on distingue habituellement les populations de lymphocytes T naïfs ou mémoires. La combinaison CD4, CD25, FoxP3 ou CD127 permet la recherche de lymphocytes T régulateurs.
- Les lymphocytes NK n'ont pas de marqueur spécifique mais la population est défini par l'absence d'expression du CD3 et l'expression plus ou moins intense de CD16 et CD56.

### **A2 Biologie moléculaire / chimérisme**

L'analyse du chimérisme par biologie moléculaire permet en fait de différencier, par des marqueurs dit polymorphes, les cellules issues du donneur et celles issues du receveur.

Ces marqueurs sont des séquences microsatellites polymorphes : elles correspondent à la répétition d'éléments composés de 2 à 4 bases nucléotidiques pour lesquels une différence a été recherchée entre le donneur et le receveur. Après extraction de l'ADN génomique, une

réaction de PCR est réalisée afin d'amplifier à la fois l'ADN du donneur et du receveur de part et d'autres du site du polymorphisme. Une des amorces utilisées est marquée par un fluorochrome afin de pouvoir étudier par électrophorèse capillaire la taille des fragments obtenus par PCR. Le polymorphisme induit une différence de taille. Un rapport de surface des pics obtenus sur l'électrophoregramme permet ainsi de quantifier la proportion de cellules du donneur et du receveur. Cette technique permet de détecter la présence de 1 à 3 % d'ADN receveur parmi l'ADN du donneur. La sensibilité peut être améliorée par une technique similaire en PCR quantitative (sensibilité de l'ordre de 0,1%)

### **A3 Test fonctionnel**

Les tests fonctionnels sont des éléments importants de suivi de la reconstitution immunitaire. Ils sont garants du fonctionnement cellulaire, notamment pour les tests de prolifération aux lectines (Phytohémagglutinine, Concanaline A, Pokeweed). Ils sont basés sur l'induction d'une prolifération cellulaire en réponse à un de ces agents. 4 jours après l'induction, un marquage par la thymidine tritiée est effectué afin d'évaluer l'incorporation de celle-ci au cours des différents cycles cellulaires. On peut utiliser d'autres techniques non radioactives comme des marquages à la bromodéoxyuridine ou au CFSE. Ces tests peuvent permettre aussi de d'évaluer une réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène spécifique comme la toxine tétanique, un extrait tuberculinique ou un peptide d'un virus (EBV, CMV, Adénovirus).

Enfin, plus récemment sont apparus les tests ELISPOT. Ces tests sont basés sur la réponse des lymphocytes à un antigène par la sécrétion d'une cytokine, souvent l'interféron  $\gamma$ , une cytokine sécrétée par les lymphocytes auxiliaires de type Th1, les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes NK. Cette technique met en évidence la sécrétion par des cellules d'une protéine (ici l'interféron  $\gamma$ ) par un anticorps monoclonal fixé sur une membrane. Après élimination des cellules, un second anticorps marqué permet la révélation (marquage par une peroxydase). Il apparaît un spot coloré : chaque spot correspond à une cellule sécrétrice. La numération des spots est ensuite corrélée aux informations cliniques et comparée à un témoin.

## **B. Caractéristiques de la population étudiée**

Nous avons réalisé une étude rétrospective des patients admis au secteur de transplantation médullaire du CHU de NANCY dirigé par le Pr BORDIGONI. Nous avons extrait les données concernant les sous-populations lymphocytaires réalisées par le service de cytométrie du service d'hématologie biologique et prescrites par les UF du service de transplantation médullaire, inscrites depuis l'installation de la nouvelle informatique des laboratoires (Logiciel GLIMS). Après un tri des données, nous avons pu obtenir un groupe de patients suivis malheureusement de manière plus ou moins systématique en terme de sous populations lymphocytaires au cours de la première année de greffe. Afin d'avoir un travail le plus systématique, nous avons isolé un groupe de patients greffés entre 2006 et 2008, vivants et n'ayant pas présenté de rechute au cours de la greffe analysée. De ce groupe, nous avons exclu les patients greffés par sang de cordons ombilical, du fait de leur faible représentativité (5 sur 65).

Les différents paramètres utilisés pour appréhender les sous populations lymphocytaires sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 2: Tableau récapitulatif des facteurs étudiés au cours de la greffe**

<b>Paramètres du receveur/donneur</b>	
Age du receveur /donneur	Regroupement des patients par tranches d'âge afin d'avoir des effectifs suffisamment importants ou corrélation (moins de 1 an, 1 à 10 ans, 10 à 25 ans, 25 à 50 ans, plus de 50 ans)
Indication de la greffe	Regroupement par groupe de pathologie similaire
Sérologie CMV	Sérologie pour le CMV du donneur et du receveur (4 options possibles)
<b>Paramètres de la greffe</b>	
Conditionnement	Myéloablatif : Avec Irradiation corporelle totale (TBI) ou Chimiothérapie seule à base de busulfan  Nom myéloablatif : A base de fludarabine et melphalan ou autre protocole  Autre : caractéristique d'une pathologie (Fanconi, Aplasie)



Prévention de la GvH	Association de médicaments immunosuppresseurs
Serum anti-lymphocytaire	Utilisation ou non de sérum anti-lymphocytaire
Origine donneur	Apparenté (familial) ou non apparenté
Greffon	Origine du greffon : moelle osseuse (MO), recueil de CSP, unité de sang de cordon
Compatibilité HLA	Compatibilité HLA-A, B, C, DR, DQ pour les greffes de CSP ou de MO (cotation sur 10) (5 allèles X2)
CD34/kg	Quantité de cellules CD34 <sup>+</sup> injecté au patient par kilo de receveur, regroupé par tranche (<2.10 <sup>6</sup> ; 2 à 4.10 <sup>6</sup> ; 4 à 6.10 <sup>6</sup> ; plus de 6.10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> / kg)
<b>Evènement post-greffe</b>	
GvH aigüe	Développement ou non d'une GvHa, quotée de I à IV
Traitement de la GvH aigüe	Traitement utilisé pour limiter l'extension et favoriser sa résolution
GvH chronique	Développement ou non d'une GvH chronique
CMV infection	Développement d'une infection à CMV
Rituximab	Recours au Mabthera <sup>®</sup> dans le cadre d'une infection à EBV ou de la GvH

### **B1 Caractéristiques de la population**

Nous avons donc abouti à une population dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3: Caractéristique de la population étudiée**

		<i>Effectif</i> <i>N=60</i>
<b>RECEVEUR</b>		
<i>Age médian (extrême)</i>		27 (1-64)
<b>SEXE</b>	<i>Homme</i>	34
	<i>Femme</i>	26
<b>Indication</b>		
	<i>APLASIE et apparenté</i>	5
	<i>DEFICIT IMMUNITAIRE</i>	2
	<i>HEMOGLOBINOPATHIE</i>	1
	<i>LAL</i>	10
	<i>LAM</i>	23
	<i>LH</i>	5
	<i>LMMCj</i>	1
	<i>LNH</i>	3
	<i>METABOLISME</i>	1
	<i>SARCOME</i>	2
	<i>SMD</i>	5
	<i>SMP phi+</i>	2
<b>GREFFE</b>		
<b>Conditionnement</b>		
	<i>Myéloablatif dont</i>	26
	<i>TBI 12 grays</i>	13
	<i>Busulfan - Autres</i>	13
	<i>Non myéloablatif dont</i>	29
	<i>Fludarabine Melphalan</i>	17
	<i>Autres</i>	12
	<i>Aplasia, Fanconi,...</i>	5
<b>Prophylaxie GvH</b>		
	<i>Ciclosporine seule</i>	5
	<i>Ciclosporine méthotrexate</i>	23
	<i>Ciclosporine Glucocorticoïde</i>	1
	<i>Ciclosporine Mycophénolate mofetil</i>	31

<b>Sérum antilymphocytaire</b>		
	<i>NON</i>	11
	<i>OUI</i>	48
	<i>Mabcampath</i>	1
<b>Grefe du même sexe</b>		
	<i>OUI</i>	35
	<i>NON</i>	24
	<i>NR</i>	1
<b>Compatibilité HLA</b>		
	<i>10/10ème</i>	49
	<i>9/10ème</i>	11
<b>Prélèvement de CSH</b>		
	<i>Moelle osseuse</i>	34
	<i>Cellules souches périphériques</i>	25
	<i>Sélection CD34+</i>	1
	<b>Quantité de CD34+ greffés médian</b>	4,41 (1,09-10,09)
<b>DONNEUR</b>		
	<b>Age médian (extrême)</b>	34 (3-68)
<b>Origine</b>	<i>Apparentée</i>	25
	<i>Non apparentée</i>	35
<b>Sexe</b>	<i>Non renseigné</i>	1
	<i>Femme</i>	27
	<i>Homme</i>	32
<b>Sérologie CMV</b>		
	<i>Donneur + / Receveur +</i>	18
	<i>Donneur + / Receveur -</i>	12
	<i>Donneur - / Receveur +</i>	12
	<i>Donneur - / Receveur -</i>	18
<b>SUITE DE GREFFE</b>		
	<b>GvH aigüe</b>	
	<i>NON</i>	17
	<i>OUI</i>	43

<i>Dont</i>	
<i>Grade 1-2</i>	40
<i>Grade 3-4</i>	3
<b>Traitement GvHa</b>	
<i>Absence d'intervention autre que prophylaxie</i>	2
<i>Glucocorticoïdes</i>	24
<i>Glucocorticoïdes méthotrexate</i>	1
<i>Glucocorticoïdes Daclizumab</i>	15
<i>Glucocorticoïdes Sirolimus</i>	
<i>Photochimiothérapie extra corporelles</i>	1
<b>GvH Chroniques</b>	
<i>NON</i>	23
<i>OUI</i>	36
<i>Non évaluable</i>	1
<b>CMV Infection</b>	
<i>OUI</i>	19
<i>NON</i>	41
<b>RITUXIMAB</b>	
<i>OUI</i>	11
<i>NON</i>	49

153 prélèvements ont été analysés à J30 (n=51), J90 (n=35), J180 (n=38) et J360 (n=29). Les prélèvements de J30 ont été réalisés entre J27 et J42, ceux de J90 entre J80 et J106, ceux de J180 entre J165 et J217, ceux de J360 entre J330 et J394

Un certain recul sera nécessaire sur l'analyse des prélèvements à J360, notamment dans les analyses à plus de deux groupes, le risque étant d'avoir un nombre de patient limité pour un des sous-groupes.

### **B2 Question posée : Analyse statistique**

La question à laquelle nous allons répondre par ce travail peut se formuler ainsi : quels sont les facteurs influençant la reconstitution des lymphocytes et leurs sous-populations ?. L'analyse statistique a été réalisée sur logiciel XLSTAT (ADDINSOFT, Paris) par des tests non paramétriques univariés de Mann Whitney (U-test) ou par test de Kruskal-Wallis. Les différences sont considérées comme significatives pour des valeurs de probabilités  $p \leq 0,05$ .

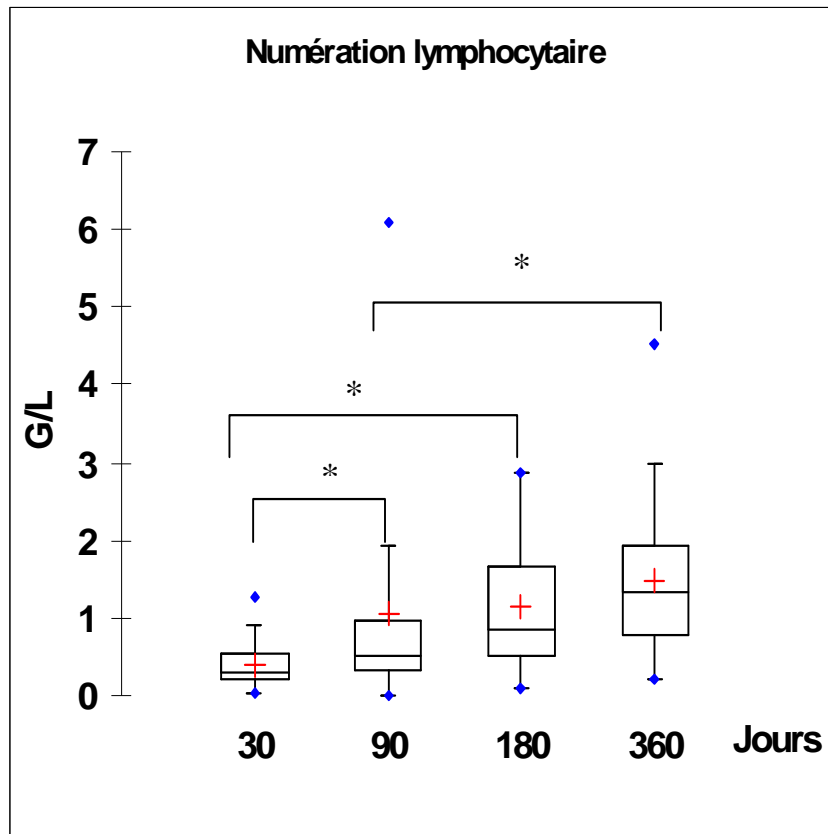
### **C. Analyse des sous-populations lymphocytaires**

L'approche la plus simple pour évaluer les lymphocytes est la numération lymphocytaire. Elle est directement accessible sur l'hémogramme après numération et réalisation d'une formule automatisée par cytométrie de flux sans marquage, ou après réalisation d'un marquage par un anticorps dirigé contre l'ensemble des isoformes du CD45 en présence de billes de calibration. Ce marquage permet de différencier trois sous-populations (Lymphocytes, Monocytes, Polynucléaires)

Cette numération permet en fait d'évaluer la lymphopénie globale, sans tenir compte des caractéristiques et de la répartition des sous populations. L'analyse des sous-populations a été réalisée sur cytomètre FACSCALIBUR (BECTON DICKINSON). Les anticorps utilisés pour marquer les cellules sont CD3 FITC, CD8 PE, CD45 PerCP, CD4 APC, CD16 + 56 PE et CD19 APC (BECTON DICKINSON, Multitest). 10 µL d'anticorps sont ajoutés à 100 µL de sang total. Après une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière, une lyse des hématies est réalisée par ajout de 500µL de BD Facs Lysis Solution (BECTON DICKINSON).

Parmi nos 60 patients, la numération lymphocytaire rejoint une distribution physiologique entre J180 et J360 (Figure 11).

Le compte lymphocytaire total s'accroît continuellement entre J30 et J360 post allogreffe. Il atteint une valeur normale (>1 G/L) dès 90 jours en moyenne, cette valeur est « artefactuellement » élevée, liée à quelques patients ayant une prolifération lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> en réaction à une infection virale. Cependant, en considérant l'ensemble des patients, il existe une différence significative entre la numération à J30 (0,394 G/L) avec celles de J90 (1,059), J180 (1,144 G/L) et J360 (1,477 G/L) (p=0,008) ainsi qu'entre celles de J90 et de J360 (p=0,008). Il n'y a pas de différence significative entre celle de J180 et J360.



**Figure 11 : Numération lymphocytaire en box-plot**

*Point bleu : valeur extrême*

*Croix rouge : moyenne*

*Box plot : 25ème centiles, médiane, 75ème centiles*

*\*  $p < 0,05$*

Ces différences existent dans l'ensemble des sous populations avec de petites différences (Figure 12) :

- Les numérations des lymphocytes B diffèrent toutes de la numération à J30 et J90 mais les mesures à J180 et J360 ne diffèrent pas significativement entre elles. Elles sont nettement inférieure à la valeur normale de l'adulte ( $B > 0,2$  G/L) durant les six premiers mois et se normalise à 1an.
- Les numérations des lymphocytes T4 à J180 et J360 diffèrent des numérations à J30 et J90 mais les mesures respectives à J180 et J360 ainsi qu'à J30 et J90 ne diffèrent pas significativement entre elles. L'immunité dépendante des cellules T  $CD4^+$  peut être considérée comme immunologiquement intéressante au-delà de  $0,2$ G/L, seuil dépassé seulement à J360 en moyenne, marquant ainsi une génération

lymphocytaire T4 faible. Malheureusement, l'étude de sous populations plus détaillées, notamment naïves et mémoires, n'est présente que pour quelques patients, ne permettant de fournir d'informations suffisamment fiables sur la production de cellules naïves issues du donneur.

- Les numérations des lymphocytes T8 à J90, J180 et J360 diffèrent de la numération à J30 mais les mesures à J90, J180, et J360 ne diffèrent pas significativement entre elles. La numération atteint rapidement un seuil physiologique (0,4G/L) dès 90 jours en moyenne.

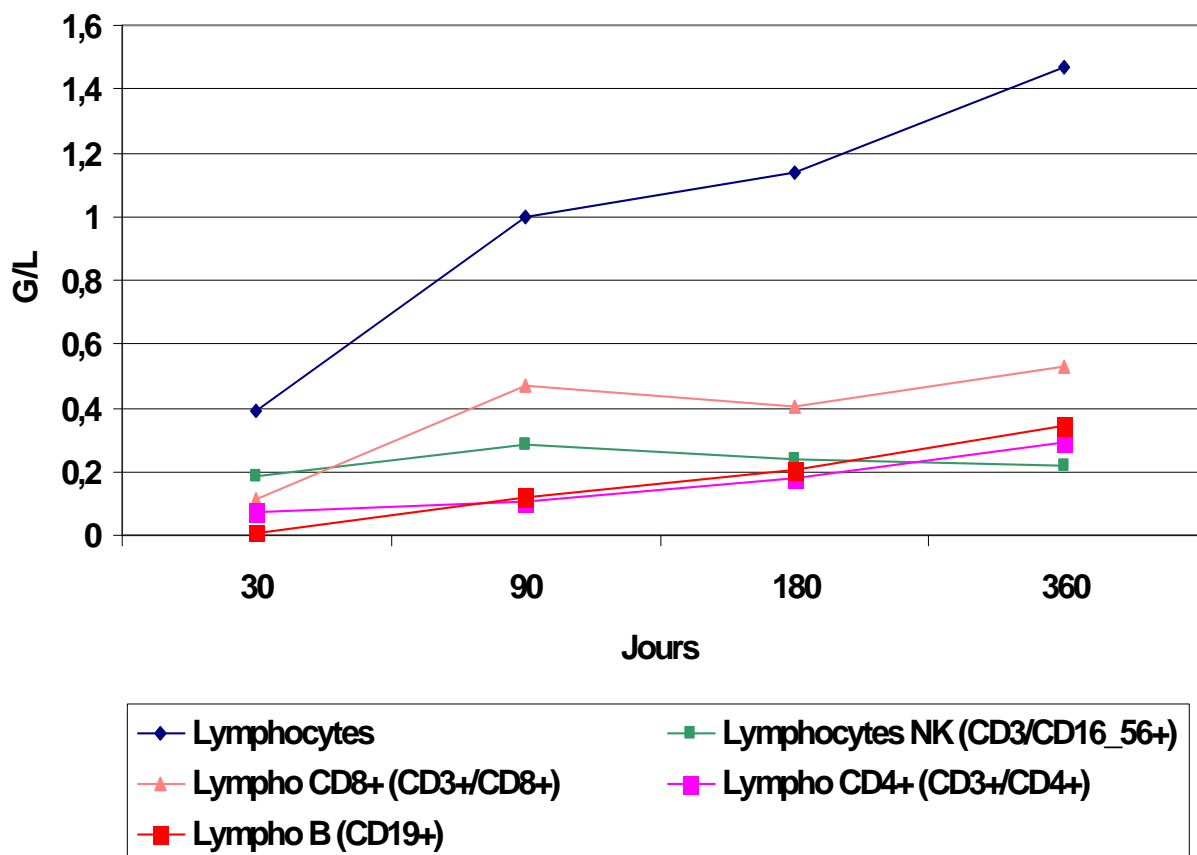


Figure 12 Numération des lymphocytes et des sous populations entre 1 et 12 mois post allogreffe.

## **C1 Impact du conditionnement**

Le conditionnement peut être étudié de deux manières, soit d'une manière général en différenciant les conditionnements myéloablatif et non myéloablatif, soit en distinguant 4 groupes : 1) les myéloablatifs utilisant une irradiation corporelle totale (TBI 12 grays) 2) Les myéloablatifs utilisant une chimiothérapie (basée essentiellement sur le busulphan 16mg/kg), 3) les conditionnements non myéloablatifs associant fludarabine et melphalan, 4) les autres basés sur une chimiothérapie associant fludarabine (90mg/m<sup>2</sup>) et irradiation corporelle à faible dose (TBI 2grays) ou une chimiothérapie seule.

Au sein de la population lymphocytaire totale (Figure 13, Annexe A), on constate une différence significative entre les numérations lymphocytaires à J30 post allogreffe ( $p=0,019$ ) entre le groupe myéloablatif (MA) et non myéloablatif (NMA). Cette différence existe au sein des sous populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ( $p<0,001$ ). Pourtant, il a été décrit que les patients greffés par des conditionnements à intensité réduite ont une reconstitution T plus rapide pendant les 6 premiers mois de la greffe<sup>89</sup>. Cette différence n'est pas observable dans notre population : au sein de la numération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la différence entre les deux groupes est significative qu'à J360 ( $p<0,01$ ) en faveur des conditionnements myéloablatifs, résultat en accord ceux de l'étude de *Maris et al*<sup>90</sup>. Cependant, les groupes de patients ne sont pas totalement homogènes, le groupe de patients greffés par conditionnement myéloablatif est plus jeune que ceux greffés par conditionnement non myéloablatif (Tableau 4). Ainsi cet écart est à prendre avec une certaine tolérance vis à vis de valeur physiologique cible plus élevée chez l'enfant.

*Maris et al* ont constaté par ailleurs une expansion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs plus importante à J360 en faveur des conditionnements à régime myéloablatif. Notre étude retrouve également cette différence significative pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup> ( $p=0,008$ ) mais pas pour les lymphocytes T8<sup>90</sup> (Figure 13). Cependant, cette étude présente le même biais, les receveurs sont plus jeunes au sein du groupe de conditionnement myéloablatif. Par ailleurs, nous n'avons pas étudié phénotypiquement les caractères naïf ou mémoire des lymphocytes T.

Nous observons à J90 au sein des sous-populations T CD8<sup>+</sup> et NK une variation, non significative (écart type important), ces proliférations sont associées à des infections virales, généralement de type CMV ou EBV au cours des 100 premiers jours de la greffe bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les groupes (tableau 5) ( $p=0,55$ ). Cette expansion plus importante en conditionnement myéloablatif est essentiellement présente chez les patients



conditionné par TBI 12 grays, supposant une plus grande facilité d'expansion des cellules du donneur en cas de conditionnement intense. Cependant, notre étude présente un biais, l'ensemble des infections n'a pas été pris en compte.

Parmi les différents conditionnements (Figure 14, Annexe B), la différence observée sur les lymphocytes à J30 existe essentiellement entre le conditionnement myéloablatif de type TBI 12 grays et les 3 autres ( $p < 0,02$ ), cette différence est liée à une numération lymphocytaire T4 et T8 plus élevée chez les patients recevant un conditionnement à forte dose d'irradiation.

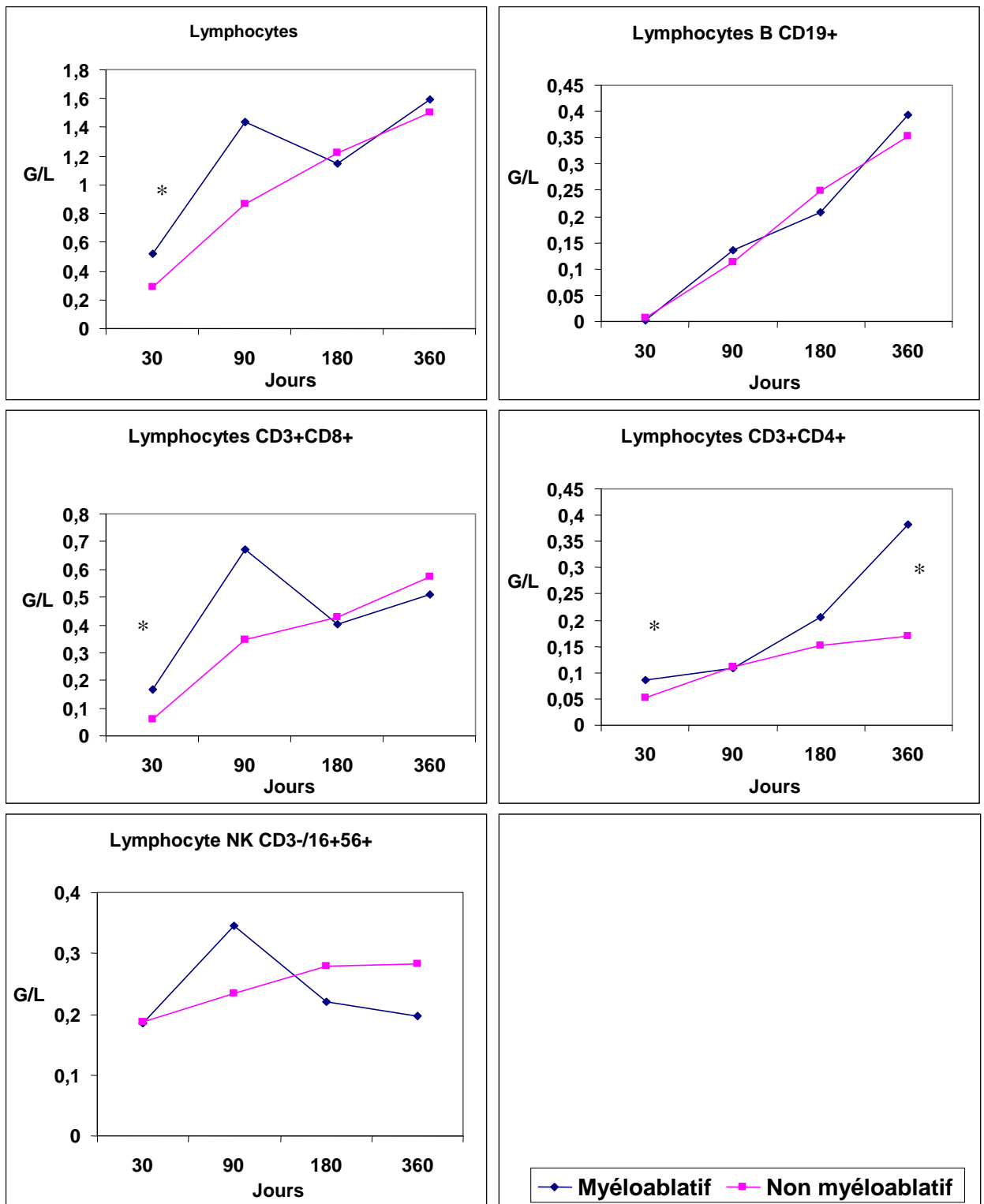
Comme précédemment cité, nous n'observons pas une meilleure reconstitution des sous populations lymphocytaires à 6 mois, ni à 1 an après allogreffe avec conditionnement atténué. Nous pouvons également observer que la reconstitution de la sous population T CD4<sup>+</sup> des conditionnements myéloablatifs à base de busulfan semble meilleure avec des conditionnements atténués ( $p = 0,04$ ). Cette différence peut s'expliquer par le faible échantillonnage à J360 dans le groupe busulfan et par la jeunesse des patients de ce groupe (3 patients ont moins de deux ans). Par ailleurs, cette meilleure reconstitution n'est pas rapportée par d'autres travaux.

**Tableau 4: Age des patients en fonction du conditionnement**

<b>AGE Receveur (ans)</b>	<b>Myéloablatif</b>	<b>Non myéloablatif</b>	<b>p</b>
< 1	2	1	ns
1 à 10	7	1	0,002
10 à 25	4	8	ns
25 à 50	13	9	ns
> 50	0	10	0,002

**Tableau 5: Proportion des infections à CMV en fonction du conditionnement**

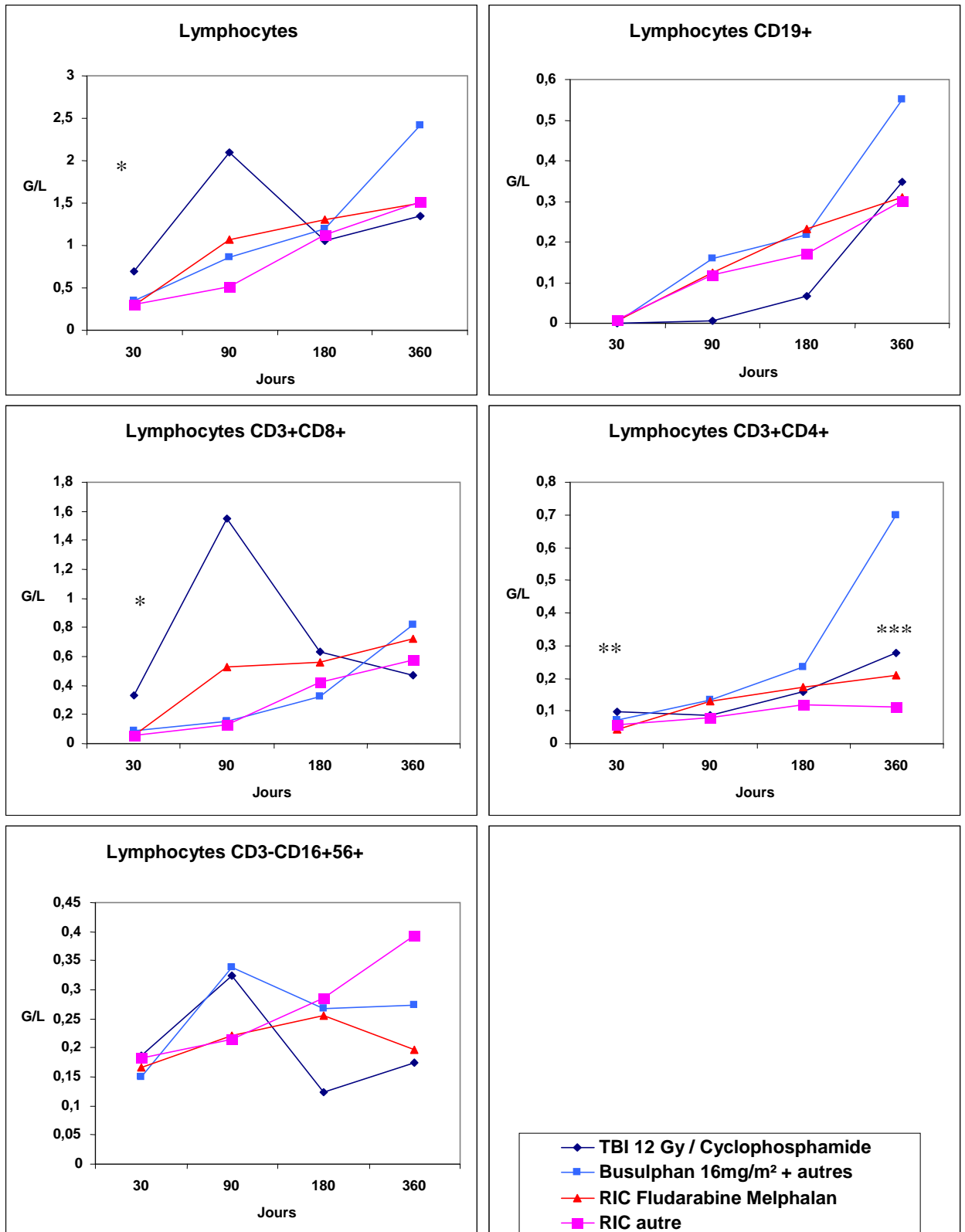
	<b>INFECTION A CMV</b>	<b>ABSENCE INFECTION CMV</b>	<b>p</b>
<b>Myéloablatif</b>	8	18	ns
<b>Non myéloablatif</b>	11	18	ns



**Figure 13 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du conditionnement. (ANNEXE A)**

Représentation des moyennes des sous-populations lymphocytaires

\* :  $p < 0,05$



**Figure 14: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction des différents conditionnements. (ANNEXE B)**

Représentation des moyennes des sous-populations lymphocytaires

\*  $p < 0,05$  TBI vs 3 autres

\*\*  $p < 0,05$  TBI vs RIC

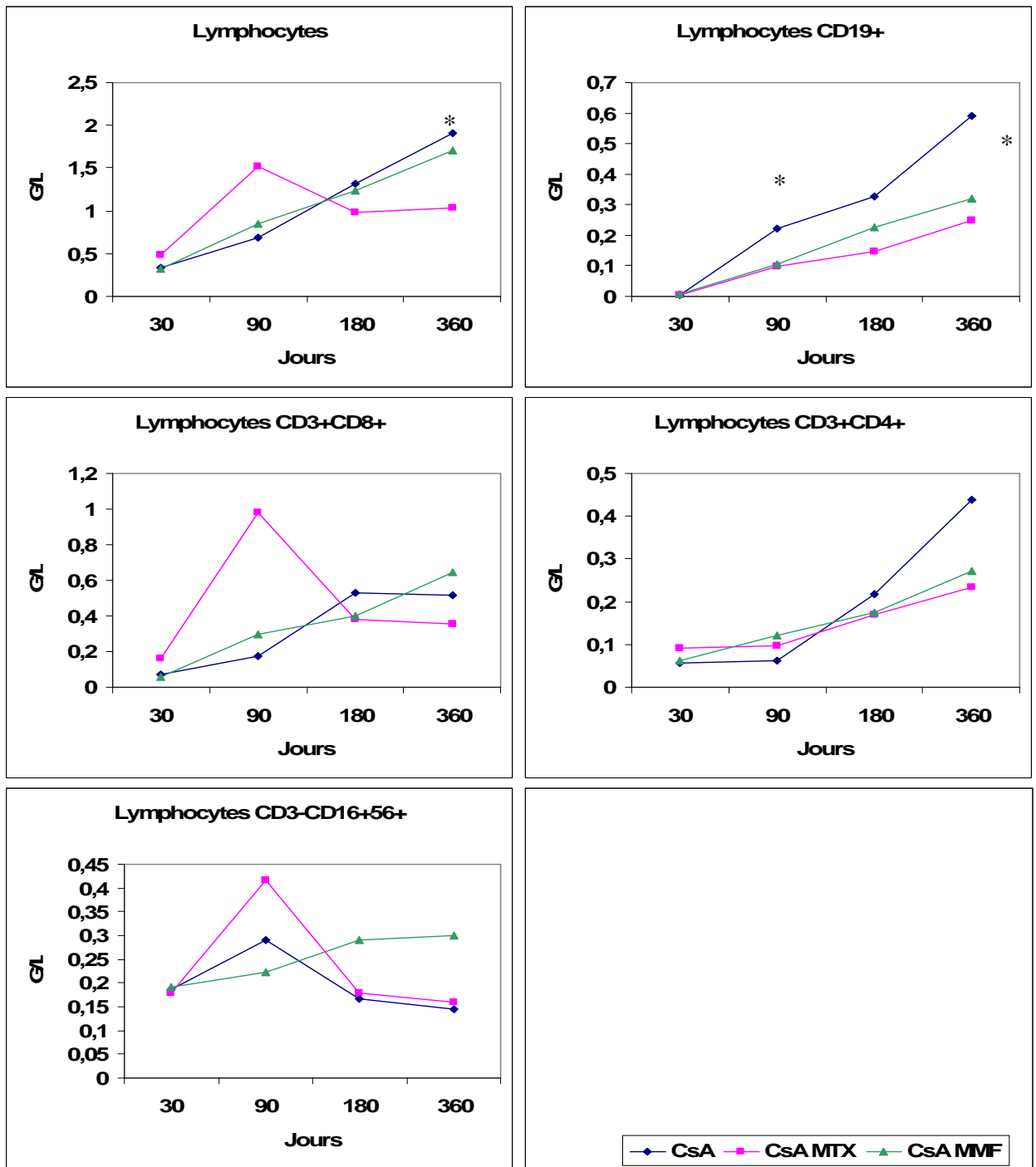
\*\*\*  $p < 0,05$  Busulfan vs RIC

Il semble se dégager que les patients ayant reçu une irradiation corporelle totale à 12 grays présentent moins de lymphocytes B en début de greffe comparés aux autres conditionnements bien que les différences ne soient pas toutes significatives. Ces résultats sont probablement liés à une forte altération du stroma médullaire par l'irradiation, dont la dépendance des cellules B est très importante en début de différenciation (Figure 6)<sup>91</sup>. Par ailleurs, le conditionnement myéloablatif composé d'une chimiothérapie seule à base de busulfan laisse entrevoir une récupération B complète meilleure mais le faible échantillonnage et la jeunesse des patients de ce groupe ne doit pas omettre d'interpréter ces résultats en fonction de l'âge où la numération lymphocytaire B est plus élevée (0,7 à 2,6 G/L) que chez l'adulte ou l'adolescent (0,1 à 1 G/L). Cet accroissement de la sous population lymphocytaire tend vers des valeurs physiologiques<sup>92</sup>.

Les lymphocytes NK sont peu influencés par le conditionnement. Cependant, nous ne pouvons pas différencier par nos marquages les deux dernières étapes de leur différenciation (Figure 9).

### **C2 Impact de la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte**

La maladie du greffon contre l'hôte est la complication majeure dans les suites de la greffe de CSH. Indépendamment de son effet délétère en termes de morbidité et de mortalité, elle reflète l'incompatibilité du système immunitaire du donneur avec les tissus du receveur. Cette maladie est associée à un effet thérapeutique, l'effet du greffon contre la tumeur. Cependant, l'effet GvH est délétère et une stratégie de prophylaxie est nécessaire. Parmi nos 60 patients, 3 groupes sont analysables statistiquement : le groupe de patients recevant de la ciclosporine seule (n=5), le groupe associant la ciclosporine au méthotrexate (n=23) et un groupe associant ciclosporine et mycophénolate mofetil (31). La ciclosporine (CsA) est un inhibiteur de la calcineurine, empêchant l'activation des lymphocytes T. Le méthotrexate (MTX) est un inhibiteur de la dihydrofolate-réductase, une enzyme impliquée dans le cycle des donneurs de méthyl (Vitamine B 12 et méthionine) et dans le cycle des pyrimidines (notamment l'uracile qui est une cytosine méthylée). Le mycophénolate (MMF) est un inhibiteur de la synthèse des guanines, aboutissant ainsi à l'apoptose des cellules.



**Figure 15 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction des différentes prophylaxies de la GvH (ANNEXE C)**

\*  $p < 0,05$  entre CsA vs Csa/MTX

La reconstitution des populations lymphocytaires (figure 15, ANNEXE C) de manière globale semble être influencée par le traitement prophylactique de la GvH. En effet, la numération lymphocytaire des patients traités par CsA+MTX est plus abaissée à J360 que celle des patients traités par les deux autres traitements ( $p=0,04$  entre CSA et CSA+MTX ,

p=ns entre CsA et CsA+MMF). Cette diminution se révèle essentiellement parmi les lymphocytes B où la différence entre les traitements à J360 est significative entre le groupe CSA seule et CSA MTX (p=0,03) ; et à la limite de la significativité entre CSA seule et CSA+MMF (p=0,07). La ciclosporine est essentiellement un inhibiteur de prolifération T, ayant un impact probablement moindre sur les lymphocytes B que l'association avec deux inhibiteurs de la synthèse de l'ADN.

### C3 Utilisation de sérum antilymphocytaire

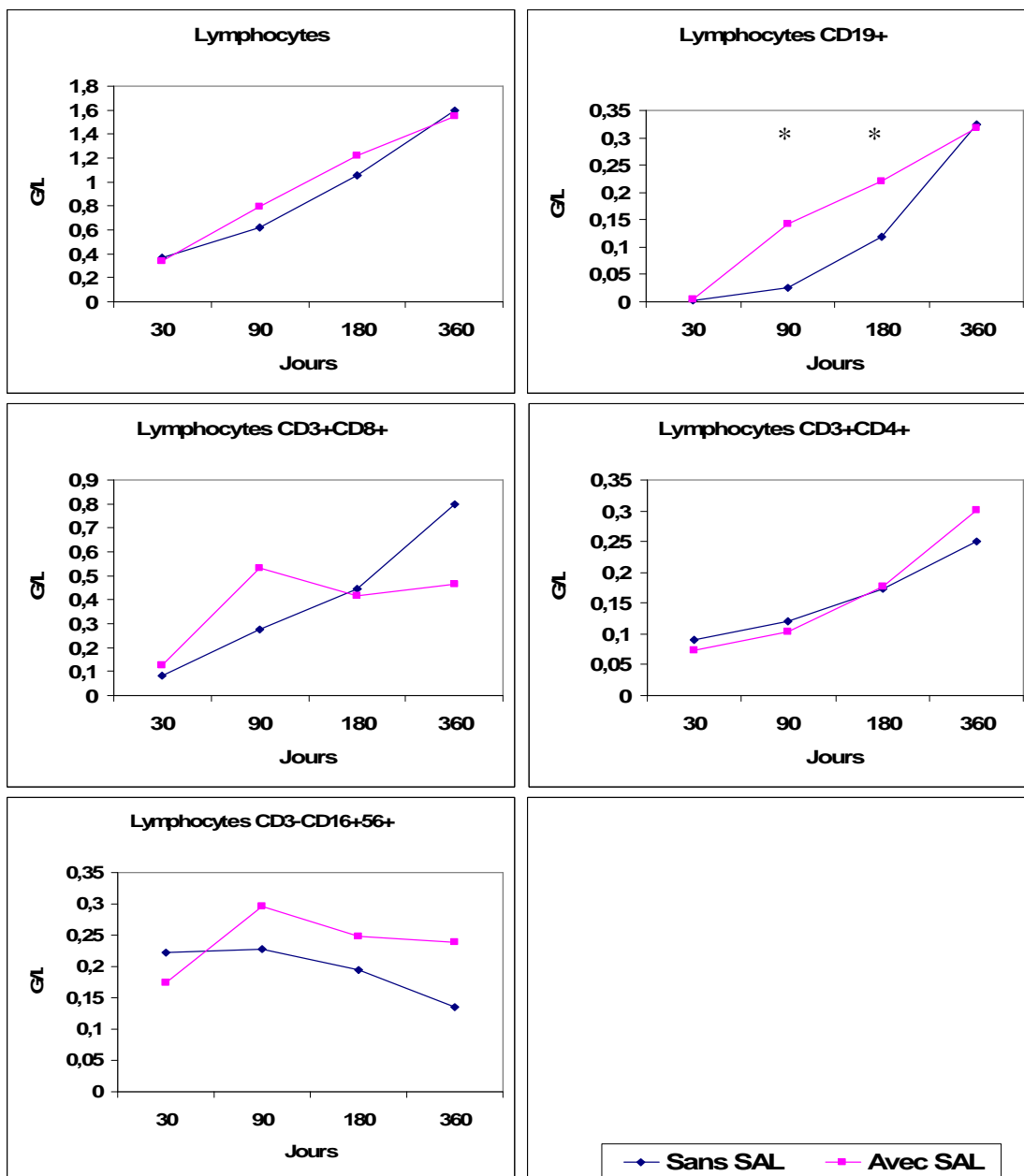


Figure 16 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'utilisation de sérum antilymphocytaire (ANNEXE D)

\*  $p < 0,05$

Les sérums antilymphocytaires sont des extraits d'immunoglobulines de lapins (ou de chevaux) immunisés par des thymocytes humains (Thymoglobulines<sup>®</sup>) ou une lignée cellulaire T Jurkatt (ATG Fresenius<sup>®</sup>). Outre la déplétion T du receveur dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires, ces sérums modulent l'activité leucocytaire, notamment en induisant une apoptose de la lignée B, en interférant avec la signalisation par les cellules dendritiques et en favorisant la formation de cellules T régulatrices et de NKT<sup>93</sup>.

L'utilisation d'un sérum antilymphocytaire au moment du conditionnement ou au cours de la prophylaxie de la GvH permet une reconstitution lymphocytaire B plus rapide qu'en l'absence d'utilisation. Les différences sont significatives à J90 (p=0,026) et J180 (p=0,011). Ces résultats sont un petit peu surprenant. En effet, le SAL contient des immunoglobulines dirigés contre des antigènes spécifiques des cellules B comme le CD19 et le CD20 mais aussi des plasmocytes comme CD138. Sa persistance au sein de l'organisme peut être encore détectée 5 semaines après la greffe. Nous aurions pu nous attendre à un résultat inverse au vu du mécanisme d'action sur les cellules lymphocytaires B. Cependant, cette immunoprophylaxie permet en fait de réduire l'incidence de la GvH, un des facteurs altérant beaucoup la lymphopoïèse B<sup>91</sup>.

Récemment, l'utilisation du rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 a été introduit dans l'arsenal thérapeutique de la maladie du greffon contre l'hôte résistante. Son action vise à éliminer les lymphocytes B, inhibant ainsi les actions immunologiques régulées par ces cellules (sécrétions de cytokines pro inflammatoires, présentation de l'antigène, ou cytotoxicité dépendante de l'anticorps).<sup>94</sup> Le SAL, par son action sur les lymphocytes B pourrait avoir une action semblable au rituximab, et donc ainsi participer à l'effet prophylactique vis-à-vis de la GvH<sup>95</sup>.

#### **C4 Donneurs apparentés, non apparentés**

Afin de pouvoir comparer ces échantillons sans impact d'une différence HLA, nous avons décidé d'écarter les patients présentant des incompatibilités HLA, le but étant de pouvoir comparer des patients allogreffés 10/10<sup>ème</sup> de manière géno-identique avec des patient greffés 10/10<sup>ème</sup> de manière phéno-identique. Ainsi l'effectif est de 49 patients. Il n'existe pas de différence significative pour la numération lymphocytaire totale entre les patients apparentés et non apparentés. Il en est de même pour les sous populations lymphocytaires B, T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et NK, bien que la reconstitution T CD4<sup>+</sup> apparaisse toujours un peu meilleure chez les patients apparentés(p=0,17). L'origine intrafamiliale, qui peut favoriser également une

proximité entre les antigènes mineurs, ne semble pas influencer significativement la reconstitution des sous populations lymphocytaires. Cependant, à la différence des locus HLA dont la transmission est réalisée par haplotype, les antigènes mineurs ne sont pas transmis en accord avec le HLA. Nous ne pouvons donc pas entrapercevoir de différence liée à d'autres antigènes car notre étude ne repose pas sur un échantillon suffisamment important.

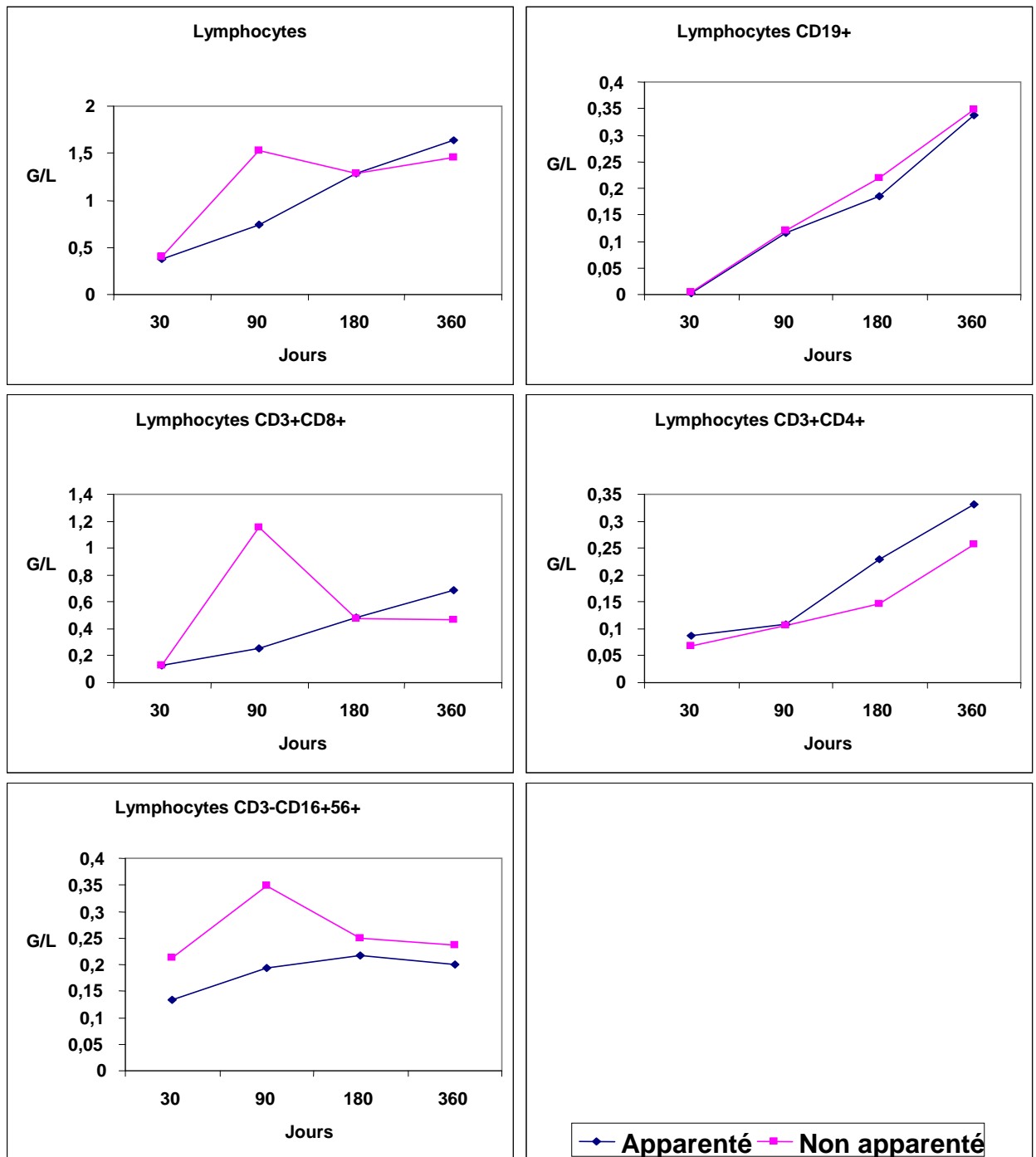
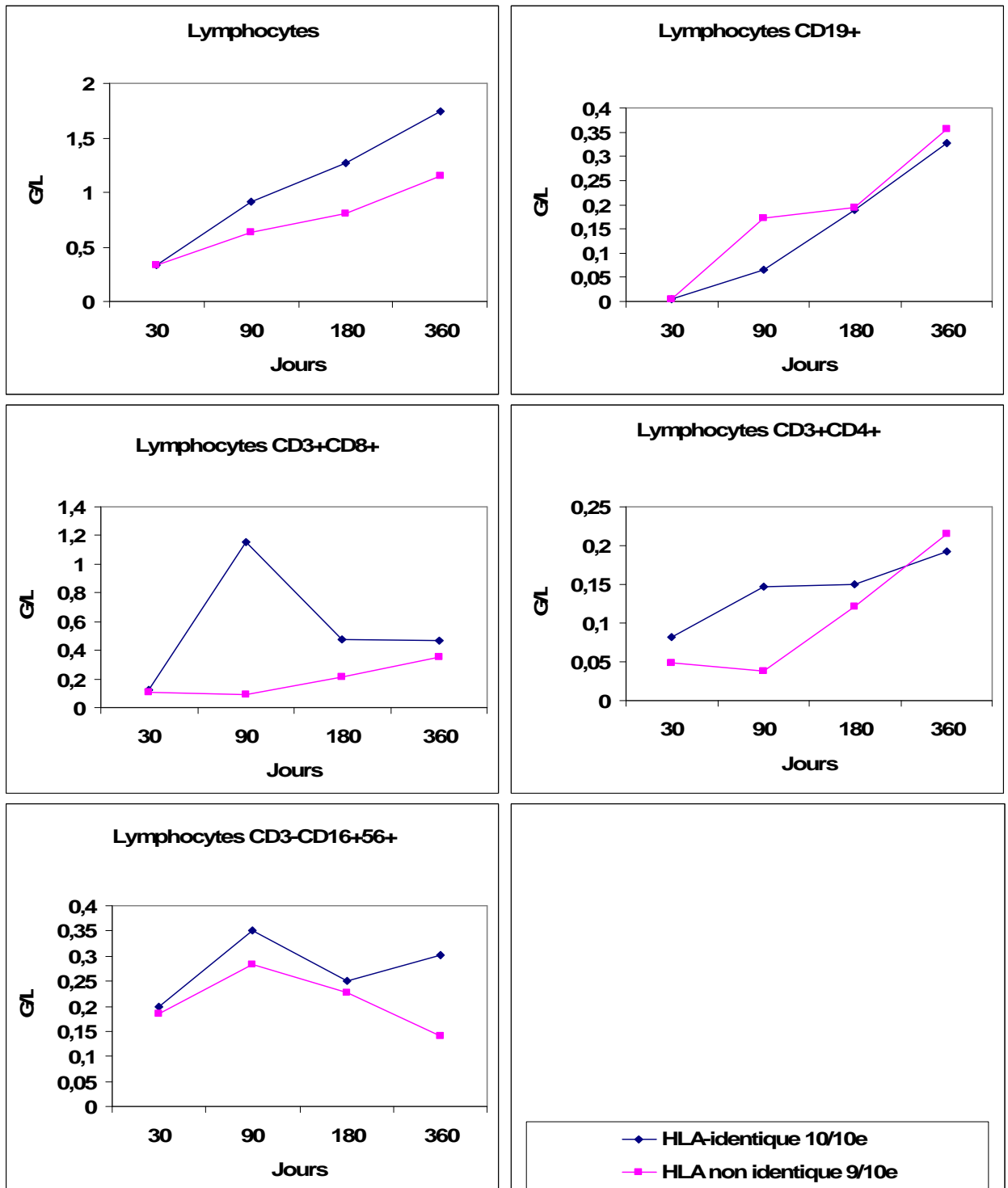


Figure 17 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'origine du donneur chez des patients greffés 10/10<sup>ème</sup> (ANNEXE E)



## C5 Compatibilité HLA



**Figure 18: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'identité HLA chez des patients non apparentés (ANNEXE E)**

*Ns : non significatif*

De la même manière que précédemment, nous avons écarté la population de patients greffés avec un donneur apparenté géno-identiques, le but étant de comparer des patients

greffés de manière phéno-identique avec des patients présentant une incompatibilité HLA. L'effectif étudié sera réduit à 35 patients. Il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes pour les différentes sous populations et pour les lymphocytes totaux. Cette absence de différence provient essentiellement de la faible taille des échantillons, notamment du groupe HLA 9/10<sup>ème</sup>. Cependant, on constate une moins bonne reconstitution T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> chez les patient greffés 9/10<sup>ème</sup>.

### **C6 Type de prélèvement Moelle ou CSP**

Les patients sont greffés par différents types de greffons, certains sont issus d'un prélèvement médullaire, d'autres issus d'un recueil de CSP après stimulation par un facteur de croissance. Ces deux types de prélèvement diffèrent dans leur composition : il y a plus de lymphocytes et de CSH au sein des CSP que dans la moelle osseuse, la moelle contient plus de progéniteurs en cours de différenciation, notamment des progéniteurs B et probablement des cellules issues du stroma médullaire absent dans les CSP.

Dans notre cas, nous ne trouvons pas de différence significative à J30, J90, J180, J360 entre les deux groupes pour la numération des lymphocytes totaux et de leurs sous populations, quoique la numération des lymphocytes B comme celle des NK tend à être plus élevée chez les receveurs de greffe de moelle que de CSP (B : p=0,09, NK : p=0,07). Ces différences pourraient se révéler significative sur un échantillon plus grand, le groupe CSP ne représentant plus que 7 patients à J360.

Certaines équipes rapportent une différence dans la numération lymphocytaire totale et T CD4<sup>+</sup> à partir du 3<sup>ème</sup> mois<sup>96</sup>, voire dès le premier mois<sup>97</sup> en faveur des patients greffés par CSP, persistant au-delà du sixième mois, voire plus tardivement. Cette numération est essentiellement associée à une numération plus élevée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (naïf). Cependant, à l'exception de l'équipe de J.Storek<sup>21</sup>, les deux autres travaux ne présente pas une persistance à J360<sup>20,97</sup>. Ces différences proviennent probablement de la composition des échantillons de patients : l'échantillon des études de Storek *et al* et Abrahamsen *et al* sont composés de patients ayant reçu un greffon uniquement après conditionnement myéloablatif, et d'origine familiale, l'étude<sup>97</sup> de Heining *et al* est composée de patients ayant des conditionnements plus variés et des donneurs non apparentés. Les différences observées par ces groupes sont associées à une différence importante de composition des greffons en terme cellulaire, notamment en cellules T accompagnantes.

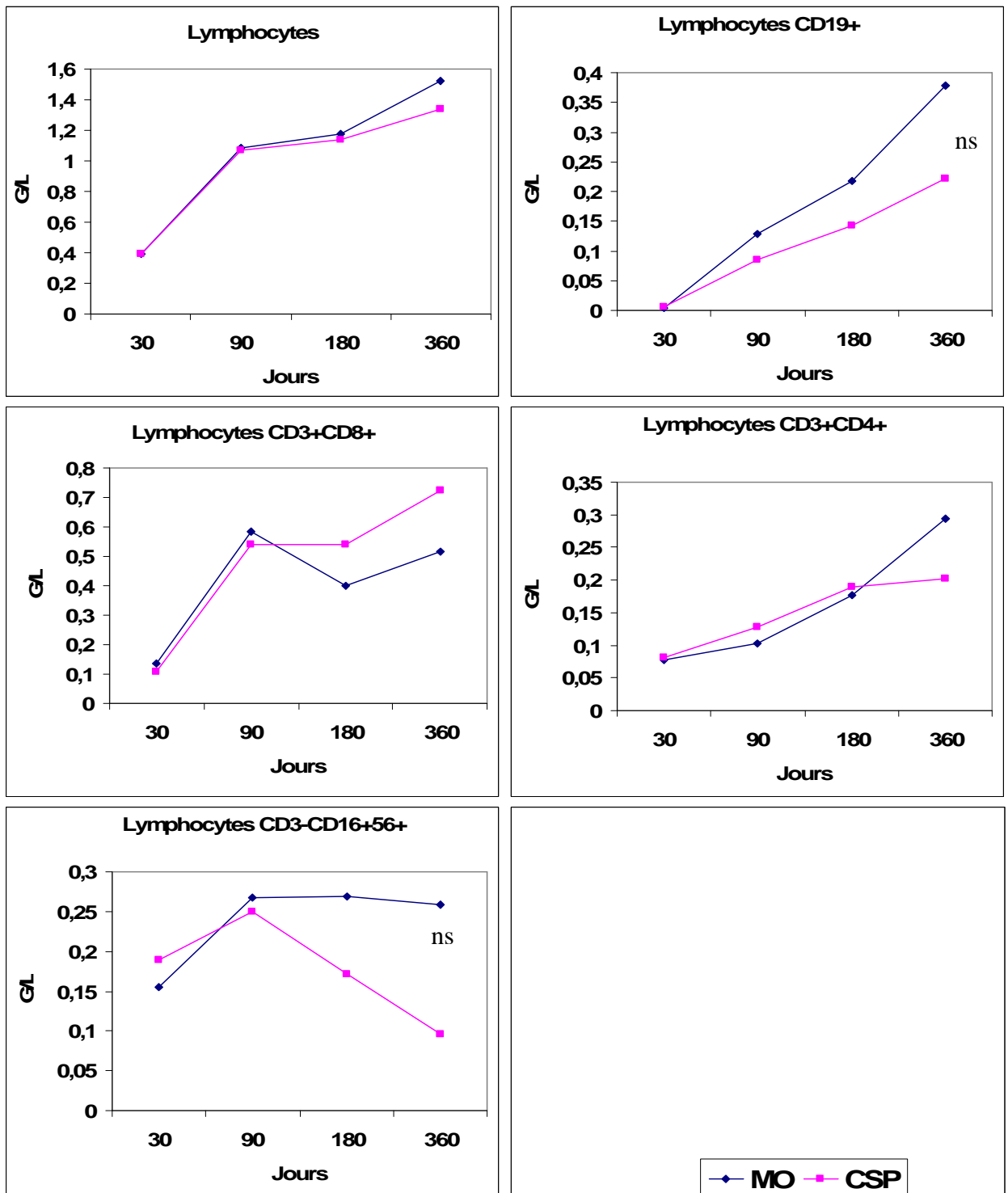


Figure 19 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du type de greffe (ANNEXE F)

On remarque que la numération des cellules B des patients greffés en moelle osseuse semble plus élevée (différence non significative  $p=0,092$  à J360). Cependant, plusieurs études ont rapporté une cinétique de reconstitution plus rapide des lymphocytes B pour les patients

greffés par CSP entre 3 et 6 mois mais sans différences à J360<sup>20,97</sup>. L'équipe de *Storek* a rapporté une différence significative en faveur de la moelle pendant les premiers mois<sup>21</sup>. Ces différences proviennent du conditionnement et de la richesse en progéniteurs et en cellules B matures du greffon. En effet, une numération des lymphocytes B plus importante peut être attendue précocement chez les patients allogreffés avec des CSP, car celle-ci sont plus riches en lymphocytes B mais cette différence devrait s'amoinrir entre les deux groupes car les prélèvements issus de moelle osseuse sont plus riches en progéniteurs B, favorisant par la suite une reconstitution B naïve plus importante. Néanmoins, l'incidence de la GvH est plus importante au sein des patients greffés par CSP, facteur favorisant une plus mauvaise reconstitution des cellules B<sup>98</sup>. Récemment, il a été rapporté qu'un plus grand nombre de lymphocytes B dans le produit d'aphérèse est associé à un risque de GvH aigüe plus important<sup>99</sup>.

Afin de mieux comprendre l'impact du type de prélèvement, nous avons cherché à savoir s'il existait des différences de reconstitution entre patients apparentés ou non en fonction du type de greffe utilisé (Figure 20) au risque d'observer des échantillons de faible taille (notamment dans les groupes CSP à J360). Il existe des différences nettes à J360 entre les numérations des sous populations lymphocytaires des prélèvements de moelle osseuse chez les patients greffés avec un donneur apparenté et ceux greffés avec un donneur non apparenté, notamment T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (p<0,005). La reconstitution de la sous population lymphocytaire B diffère à J360 entre les patients ayant reçu une moelle osseuse et ceux ayant reçu une CSP dans le groupe apparenté (p<0,02). Ce résultat est un peu surprenant, d'autant plus que les patients greffés par CSP issue d'un donneur non apparenté ont une reconstitution normale et que les patients greffé par CSP issue d'un donneur non apparenté ne reconstituent pas à un niveau physiologique (>0,2G/L).

Cependant, les groupes ne sont pas totalement homogènes du point de vue de la GvH, le groupe de patients greffés par CSP ayant une proportion de GvH chronique supérieure à ceux ayant été greffés par de la moelle osseuse (quelque soit l'origine du donneur) (18/24 patients greffés par CSP ont développé une GvH chronique contre 17/34 greffés avec de la moelle (p=0,055)), données concordante avec une étude multicentrique à plus large échelle<sup>98</sup>.

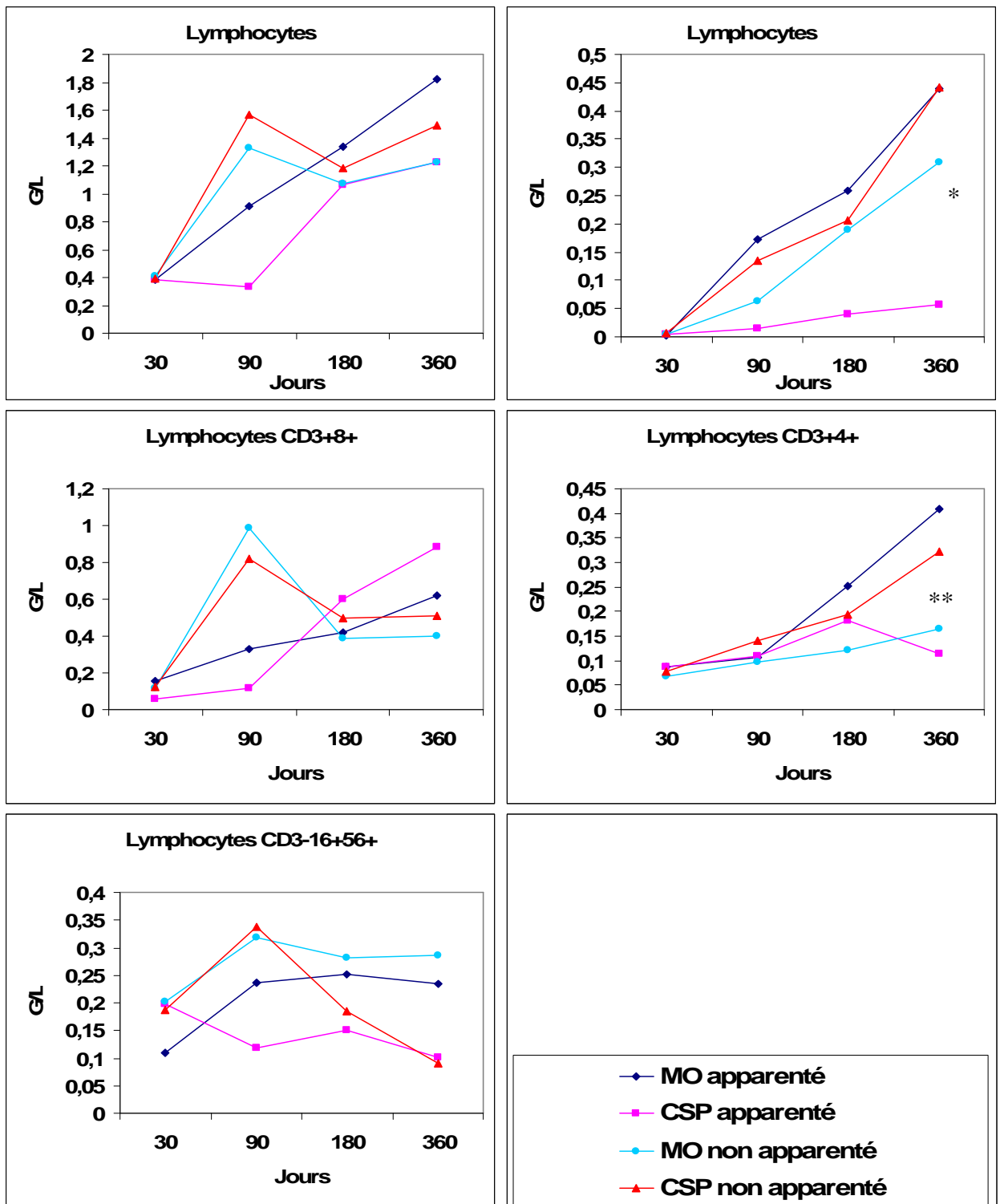


Figure 20 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du type de greffe et de l'origine du donneur (ANNEXE F)

\*  $p < 0,02$  MO apparentée/CSP apparentée

\*\*  $p < 0,02$  MO apparentée/MO non apparentée

Enfin, à l'inverse d'autres équipes, il existe dans cette étude une différence significative de numération de lymphocytes  $CD4^+$  entre les patients greffés par moelle issue de donneur apparenté et ceux greffés par CSP issue de donneur apparenté<sup>97</sup>. Cette différence provient

essentiellement de l'âge des deux groupes de patients, les patients greffés par CSP apparenté (médiane 53 ans) étant plus âgés que ceux recevant une moelle osseuse apparenté (médiane 29 ans). En effet, l'âge de receveur est l'un des principal éléments influençant thymopoïèse<sup>22,96</sup>.

### **C7 Impact de la GvH**

La GvH est une maladie résultant du conflit immunologique entre les cellules immunocompétentes du donneur et les cellules des tissus du receveur. Ces maladies complexes sont à l'origine d'une thérapeutique immunosuppressive importante au début de la greffe, qui au fur et à mesure va décroître afin de pouvoir apporter à l'organisme un système immunocompétent vis-à-vis des infections et tolérant vis-à-vis de l'hôte dans lequel elles sont résidentes.

Le développement d'une GvH est un processus complexe débutant initialement avec le conditionnement. La GvH aboutit à une attaque des cellules de l'hôte par le système immunitaire. Dans ce cadre, deux hypothèses sont possibles :

- ✓ Une expansion des cellules cytotoxiques matures liée à la présentation d'antigènes étrangers aux cellules du donneur par les cellules présentatrices de l'antigène du receveur.
- ✓ Une diminution de la lymphopoïèse associée à une attaque des tissus de support (stroma médullaire, thymus) par les cellules cytotoxiques.

A ces deux hypothèses, il ne faut pas oublier qu'il existe systématiquement un traitement à cette maladie, les conséquences de la maladie et de son traitement sont indissociables.

Dans cette optique, nous avons décidé d'aborder l'impact de plusieurs manières :

- Développement d'une GvHa (oui/non) (Figure 21, Annexe G)
- Corrélation avec le grade clinique (Figure 22, Annexe G)
- Traitement de la GvHa (Figure 23, Annexe H)
- Impact de la GvHc (Figure 24, Annexe H)

Premièrement, nous avons pu observer très peu d'impact de la GvH aigüe tout grade confondu. Les cellules les plus affectées sont les lymphocytes B. En effet, on constate une progression plus lente vers des valeurs physiologiques jusqu'à 6 mois post allogreffe

( $p < 0,02$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Storek<sup>91</sup>, bien que ceux-ci ne soient associés qu'à un régime de conditionnement myéloablatif.

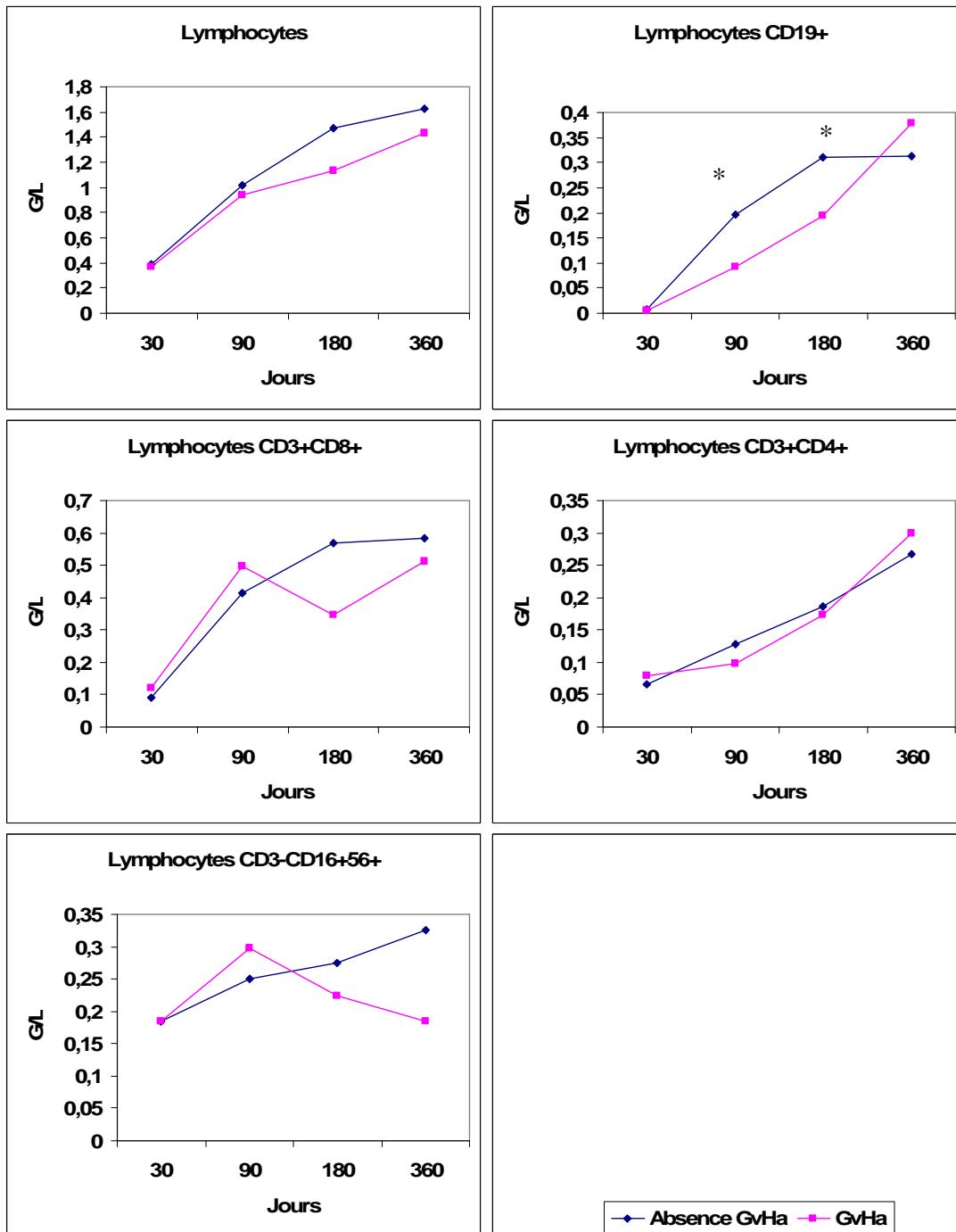


Figure 21: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du développement d'une GvH aigüe (ANNEXE G)

\*  $p < 0,02$

Deuxièmement, bien que l'effectif de la population de patients ayant une GvH aigüe de grade III-IV soit faible ( $n=3$ ) et que leur suivi aux différentes étapes ne soit pas complet, la

tendance est évocatrice d'une lymphopénie persistante importante, sans retour à des valeurs physiologiques quelque soit la sous-population étudiée. L'impact sur l'ensemble des sous-populations lymphocytaires peut évoquer un mécanisme central (destruction, anomalie de différenciation des progéniteurs lymphoïdes).

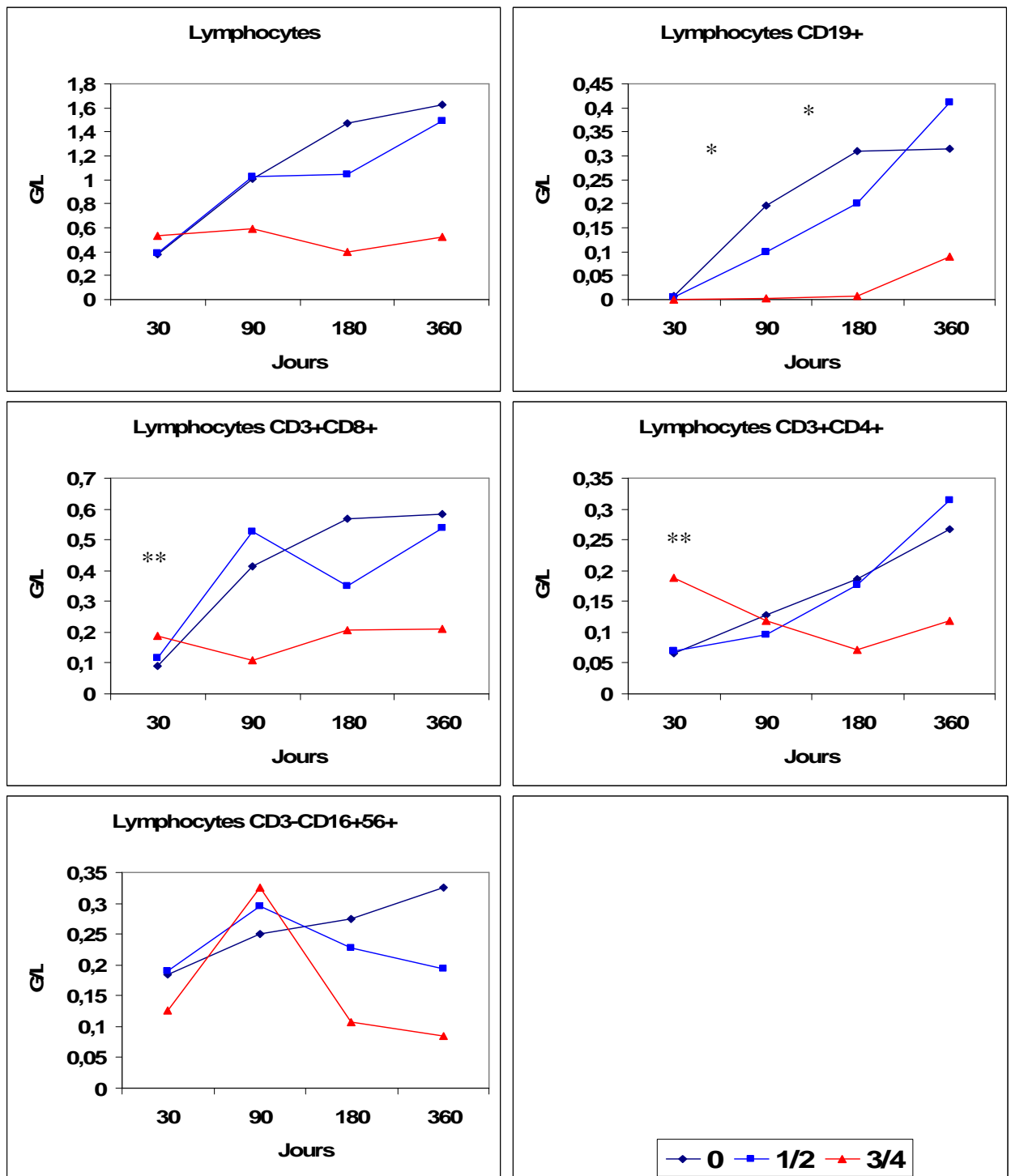


Figure 22: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du grade de la GvH aigüe (ANNEXE G)

\*  $p < 0,05$  pas de GvH et grade 1/2

\*\*  $p < 0,05$  GvH grade 3/4 et grade 0



Par ailleurs, il existe une différence significative des entre les numérations à J30 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (p=0,03) des patients développant une GvH de grade III-IV comparée à ceux n'ayant pas développé de GvH. Cette différence pourrait correspondre à une expansion des cellules allogéniques présentes dans le greffon. Cependant, une étude sur un plus grand nombre de patients serait nécessaire, avec notamment l'étude des populations T effectrices et mémoires avant conditionnement et au cours des 30 premiers jours.

Troisièmement, le traitement de la GvH (Figure 23, Annexe H) est un élément indissociable de la maladie. Au sein des patients étudiés, et en dehors du traitement prophylactique, nous avons pu isoler trois groupes de patients : un groupe sans traitement, où seule la modification des doses du traitement prophylactique de la GvH a permis d'obtenir la résolution (ou bien si une résolution spontanée s'est opérée) (n=2), un groupe traité uniquement par glucocorticoïdes (n=24) et un groupe traité par l'association glucocorticoïdes et daclizumab (n=15).

Bien que statistiquement significatif, les différences avec le groupe de 2 patients sans traitement est à prendre avec une très grande prudence. Le traitement de la GvH aiguë peut également refléter l'intensité de celle-ci de manière indirecte. Il s'avère surtout que les traitements ont une incidence sur l'ensemble des lymphocytes et notamment les lymphocytes B. L'adjonction du daclizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le CD25 (IL-2R $\alpha$ ) s'avère plus lymphopéniant en association aux glucocorticoïdes que les glucocorticoïdes seuls (p=0,02). Cet anticorps est dirigé contre un des principaux marqueurs d'activation des lymphocytes T. Cependant, c'est également un marqueur de la population des lymphocytes T régulateur et un marqueur d'activation des lymphocytes B. L'emploi de cette thérapeutique induit donc une lymphopénie plus intense que les glucocorticoïdes, et est probablement corrélé à une GvH plus intense, altérant donc plus la lymphopoïèse. Une étude en relation avec les doses de glucocorticoïdes utilisés dans le traitement de la GvH serait intéressante, les doses pouvant être un marqueur indirect de l'intensité de la GvH.

Finalement, le développement d'une GvH chronique (Figure 24) n'est pas un élément influençant beaucoup la reconstitution des lymphocytes. Hormis la sous population B qui semble être retardée dans sa reconstitution (p= 0,02 à J180), les autres sous populations ne présentent pas de différences significatives. Cependant, cet effet ne peut pas forcément être directement lié à la GvH chronique, ce décalage peut être observée également dans les suites de la GvH aiguë. Ainsi, il est donc difficile de différencier la part des deux composantes de la maladie. De plus, les effets de la GvH chronique ont en général été

observés chez les patients ayant une GvH chronique extensive (active), données que nous n'avons pas recueillies.

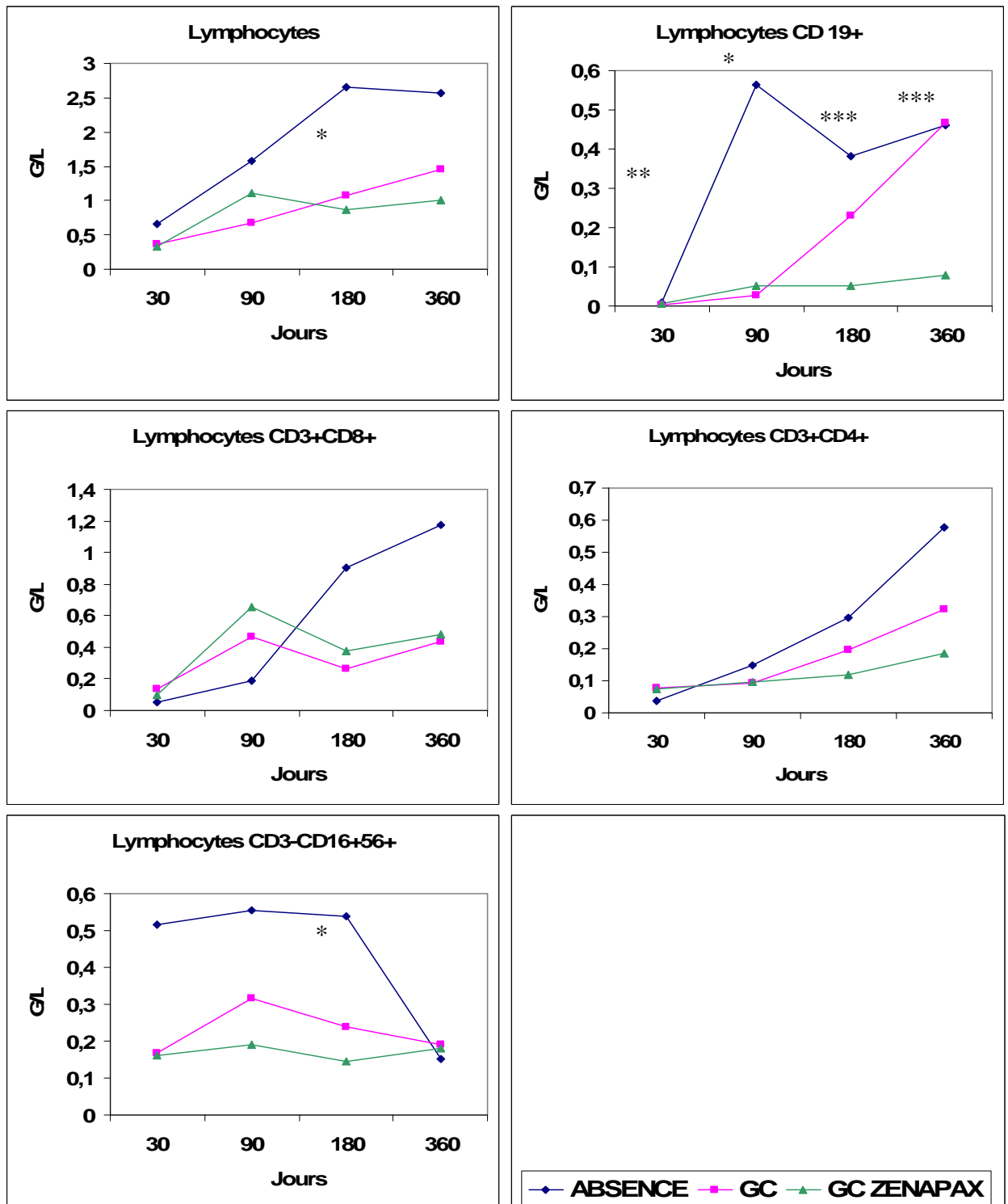


Figure 23: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du traitement de la GvHa (Annexe H)

\*  $p < 0,05$  entre absence de traitement et les 2 traitements

\*\*  $p < 0,05$  entre absence et GC Zenapax

\*\*\*  $p < 0,05$  entre GC et GC Zenapax

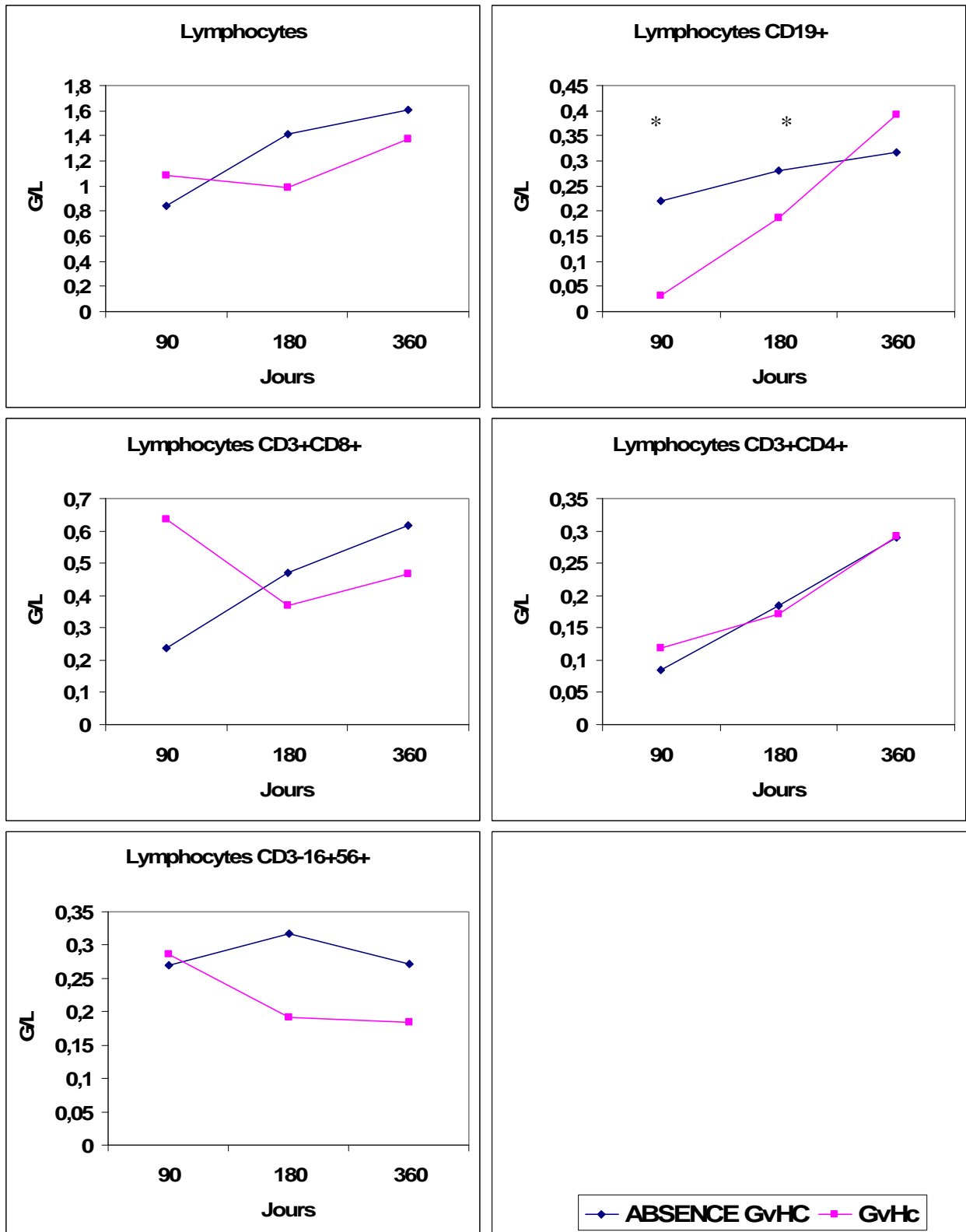


Figure 24: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la GvH chronique

\*  $p < 0,05$

## **C8 Infection à CMV**

L'infection à CMV est un élément préoccupant chez le patient greffé, d'autant plus que la séroprévalence est importante (50-85% de la population). A l'exception de l'infection chez la femme enceinte, l'infection par le CMV est rarement pathologique chez le patient immunocompétent. La réponse immunitaire à l'encontre du CMV est principalement de type cellulaire cytotoxique. Après l'infection, le virus reste latent dans le tissu épithélial et il existe un équilibre entre le virus et le système immunitaire, où ce dernier prévient les réactivations du virus. Ainsi chez le patient greffé, donc immunodéprimé, il existe des risques différents d'infection par le CMV en fonction du statut sérologique du donneur et du receveur : si le couple donneur/receveur est séronégatif (D-/R-), le risque est considéré comme faible. Par contre le risque est d'autant plus important que le virus existe préalablement chez le receveur et que les cellules du donneur ne soient pas immunocompétentes vis-à-vis de ce virus. Ainsi, on considère un risque d'infection (ou de réactivation) élevé chez les couples donneur/receveur dont seul le receveur est séropositif (D-/R+), et un risque intermédiaire pour les couples ayant un donneur séropositif (D+/R+ et D+/R-). La surveillance du CMV nécessite un suivi régulier de la charge virale afin de pouvoir mettre en place au plus tôt une thérapeutique antivirale adaptée. Cependant, il faut en plus que le système immunitaire ait la capacité d'éviter une réactivation, au risque de favoriser une GvH.

Nous avons décidé d'approcher les résultats de deux manières, l'une par la sérologie, associée au risque de réactivation, l'autre par l'infection CMV clinique ou biologique.

Dans le premier cas, l'observation des groupes nous montre qu'il n'y a pas eu d'infections à CMV dans le groupe donneur et receveur séronégatif (n=18), et une faible proportion d'infection dans le groupe donneur séropositif, receveur séronégatif (2 infections / 12 patients). Par contre, dans le groupe donneur séronégatif et receveur séropositif, il y eu 6 infections pour 12 patients, et 11 infections sur 18 patients dans le groupe donneur et receveur séropositif.

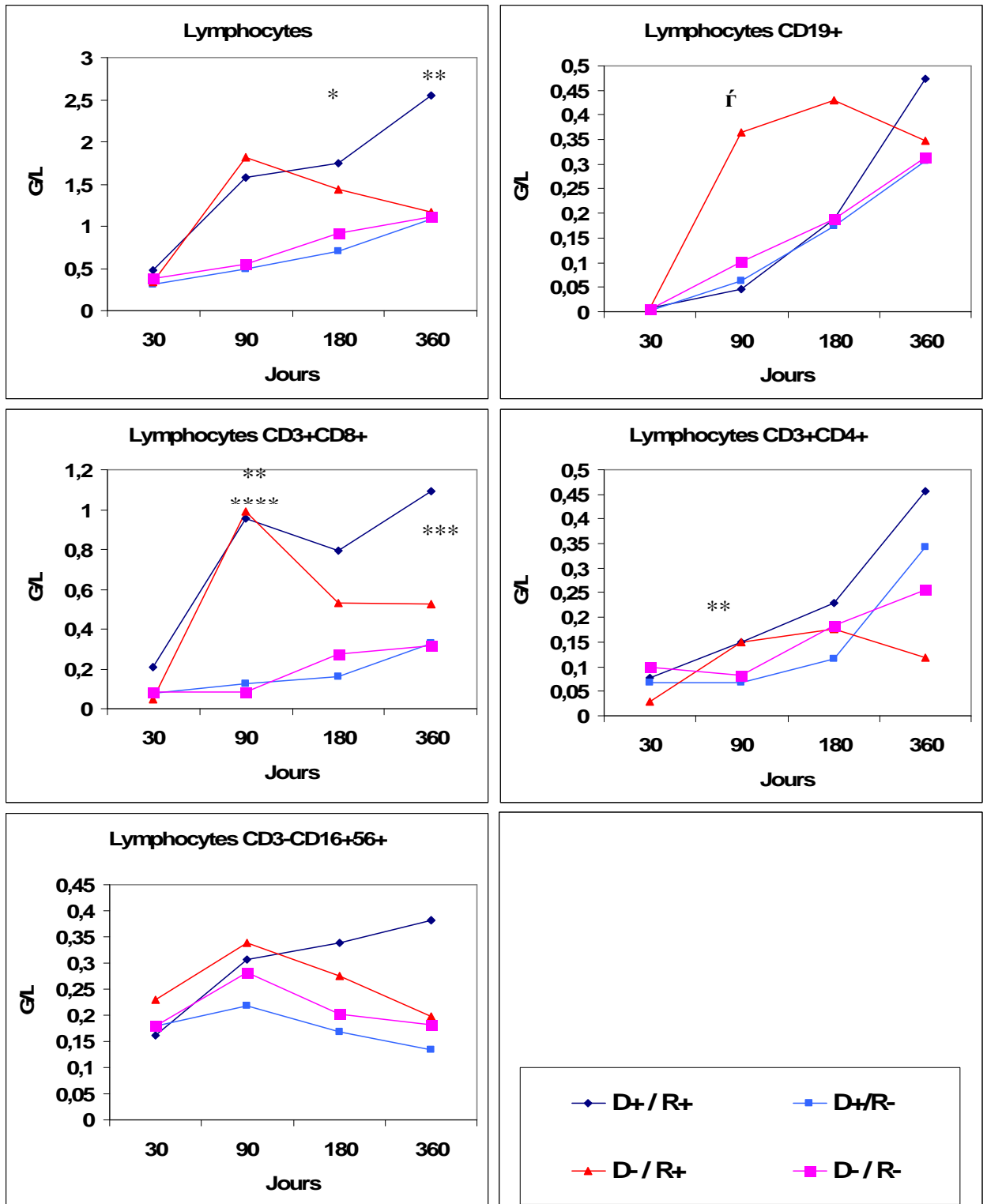


Figure 25 : Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la sérologie CMV (Annexe I)

\*  $p < 0,05$  D+/R+ vs Autre

\*\*  $p < 0,05$  D+/R+ vs Dx/R-

\*\*\*  $p < 0,05$  D+/R+ vs D-/R-

\*\*\*\*  $p < 0,05$  D+/Rx vs D-/Rx

í :  $p < 0,05$  D-/R+ vs Autre

x = quelque soit le statut sérologique

Les résultats présentés sur la figure 25 et 26 correspondent bien au développement d'une immunité cellulaire avec une augmentation des lymphocytes totaux, liée notamment au développement des cellules T cytotoxiques. Cependant, deux éléments doivent attirer l'attention : 1) la persistance à un niveau plus élevé des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> chez le couple D+/R+, 2) l'importante ascension des lymphocytes B à J90 parmi les couples D-/R+. Le premier peut s'expliquer par la persistance d'un nombre de cellules mémoires plus important car la médiation cellulaire est liée à la présence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires dans le greffon initial.<sup>100</sup> Cependant, une confirmation phénotypique des cellules T CD8<sup>+</sup> mémoire serait nécessaire. La seconde observation demeure particulière. Cette augmentation existe quelque soit le statut infectieux vis-à-vis du CMV. Ces patients n'ont par ailleurs pas présenté d'infection à EBV. Cette augmentation est-elle le reflet d'une stimulation antigénique T dépendante au cours d'un statut sérologique favorisant l'infection ?

L'infection à CMV avérée accélère la reconstitution des cellules lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> au moment de l'infection. Elle permet également un maintien de cette population à un stade physiologique, notamment chez les patients présentant un donneur séropositif ; donc possédant une immunité mémoire vis-à-vis du CMV. Cependant, cette population persistante présente un biais de diversification du TCR vis-à-vis d'autres antigènes<sup>101</sup>.

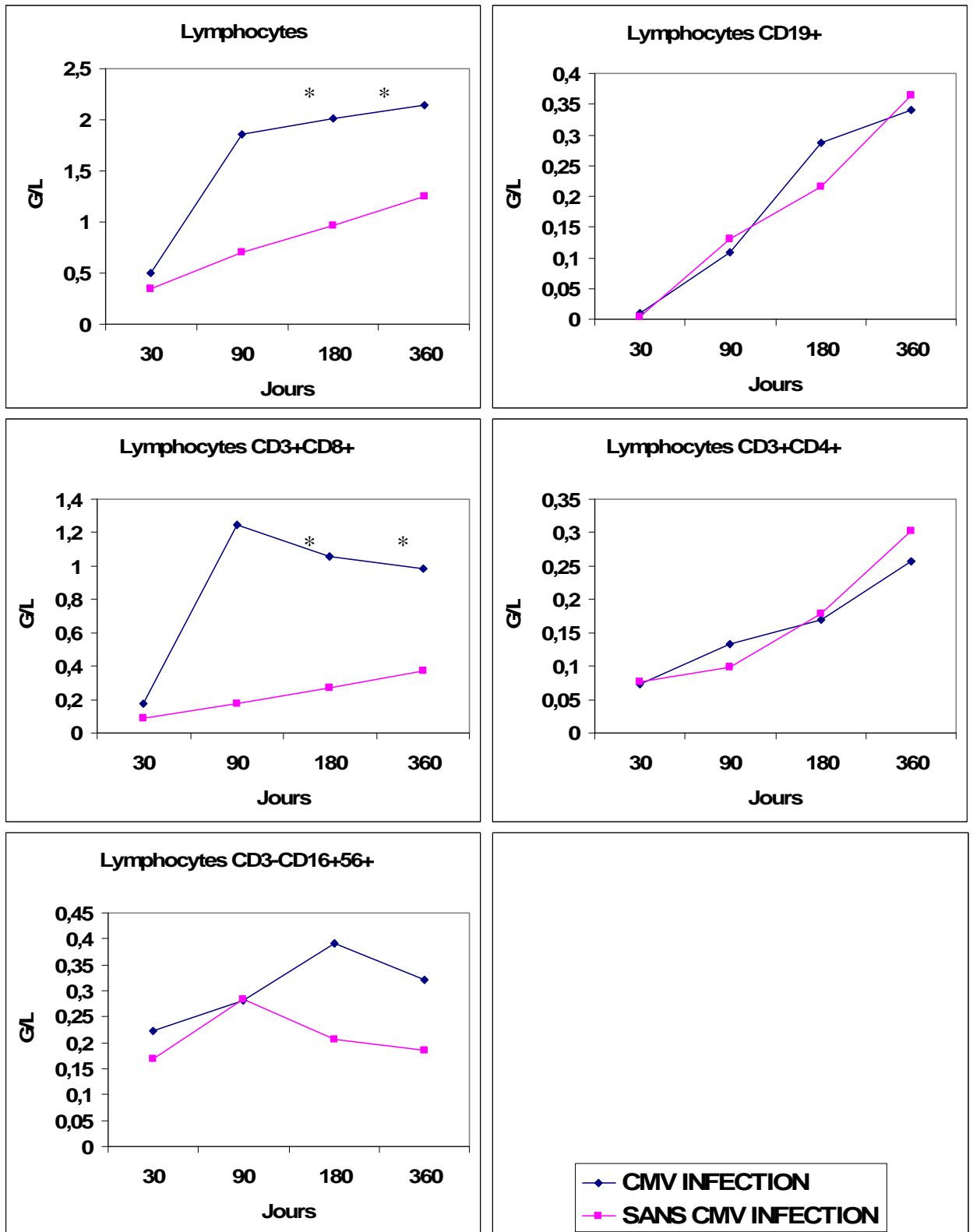


Figure 26: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'infection à CMV (Annexe I)

\*  $p < 0,05$

### **C9 Age du donneur et du receveur**

L'âge du donneur et de receveur sont deux éléments importants à explorer. Bien que nous soyons relativement immunocompétents à tout âge, nos populations cellulaires ne sont pas générées de la même manière selon celui-ci. La genèse des lymphocytes T a essentiellement lieu avant la puberté, le thymus involue après cet âge mais reste fonctionnel. L'immunité humorale diminue avec l'âge. Chez le nouveau-né, les lymphocytes T sont essentiellement de type Th2. Ils ne possèdent pas de lymphocytes de la zone marginale. Les adultes ont plus souvent des problèmes d'auto-immunité. Chez, la souris, le contingent de cellules B1a ne se développe que durant la période fœtale (et néonatale). On peut donc se poser différentes question : les CSH du donneur sont elle capables de se différencier en lymphocytes identiquement avec l'âge du receveur ? L'âge du donneur influe-t-il sur la reconstitution des sous-populations lymphocytaires ?

Le receveur reste le support de l'hématopoïèse, il fournit le stroma médullaire et thymique nécessaire au bon développement des cellules hématopoïétiques. L'âge a un impact sur le tissu thymique. La quantité d'émigrants thymiques est nettement réduite chez la personne de plus de 50 ans<sup>59,96</sup>.

Parmi nos soixante patients, 3 ont moins de 1 an, 12 sont âgée de 1 à 10 ans, 13 ont entre 10 et 25 ans, 22 entre 25 et 50ans, 10 ont plus de 50 ans.

On constate que l'âge du receveur (figure 28) semble avoir un impact sur la reconstitution cellulaire : plus le patient est jeune, plus les cellules B, T4 se reconstituent vite. Les cellules T CD8 semble être moins altérés par ce problème mais la sérologie CMV est intimement liée à l'âge puisque la séoprévalence augmente avec l'âge<sup>102,103</sup>. Pour l'analyse des cellules T, *Storek et al* avait mis en évidence par l'analyse des TREC que la lymphopoïèse T, en particulier T CD4<sup>+</sup> était diminuée avec les âges avancées<sup>96</sup>. Cependant, une analyse par régression serait probablement plus juste afin d'étudier le problème, mais le manque de donnée en point final (J360) et la dispersion de ceux-ci ne permettent pas d'utiliser ce type de statistiques. Par ailleurs, cette fonction thymique peut être altérée par le développement d'une GvH aigüe mais cette altération n'est réversible que chez le patient de moins de 25 ans<sup>22</sup>.

Nous pouvons constater que plus le donneur est âgé, plus la reconstitution des sous populations semble être altéré, notamment dans la génération de cellules T et B (figure 27). Cependant, ces valeurs ne sont pas toujours significatives car liées à un faible échantillonnage



dans les groupes extrêmes. (Il y a 3 donneurs de moins de 10 ans, 13 âgés de 10 à 25 ans, 40 âgés de 25 à 50 ans, 4 de plus de 50ans).

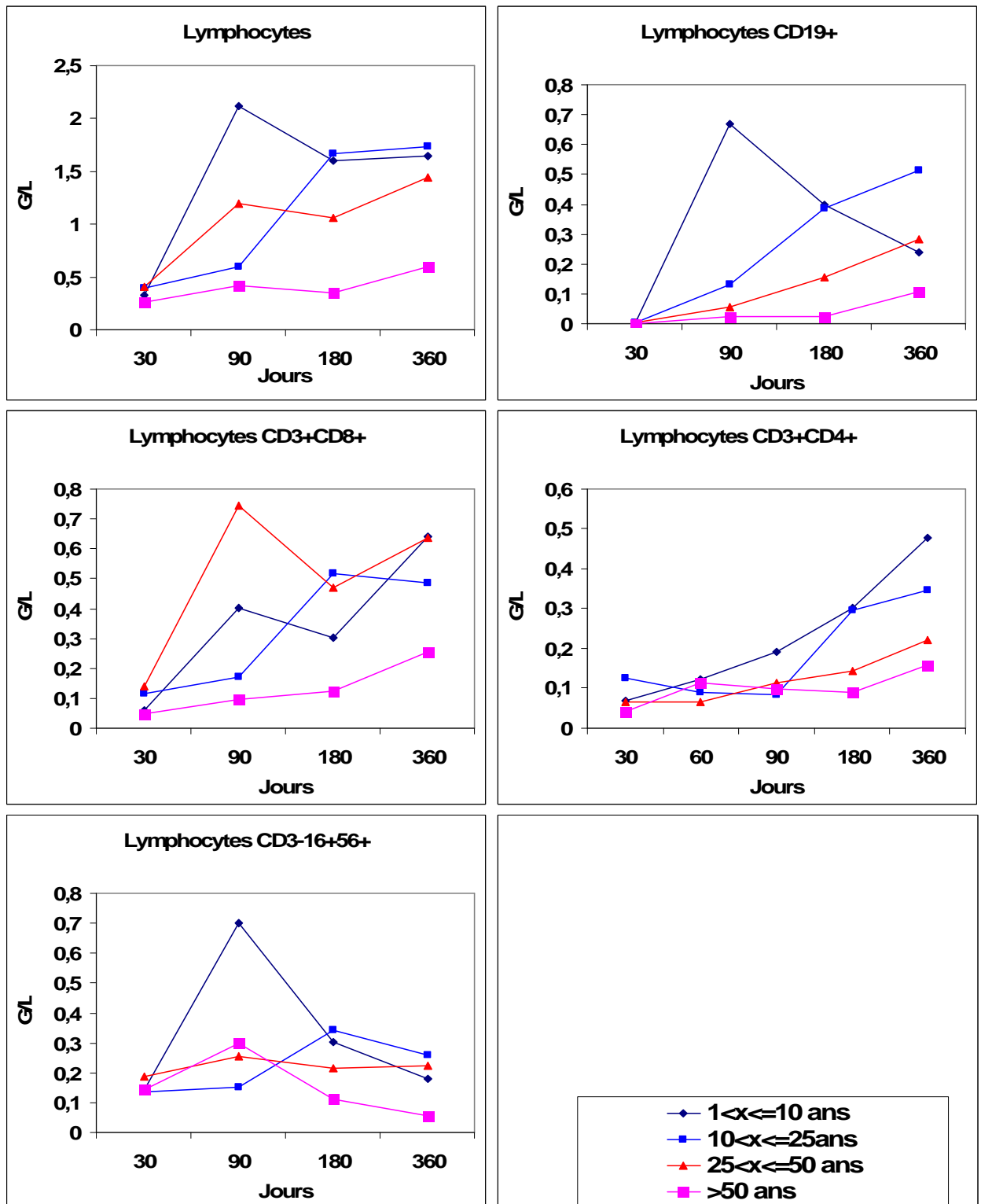


Figure 27: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'âge du donneur

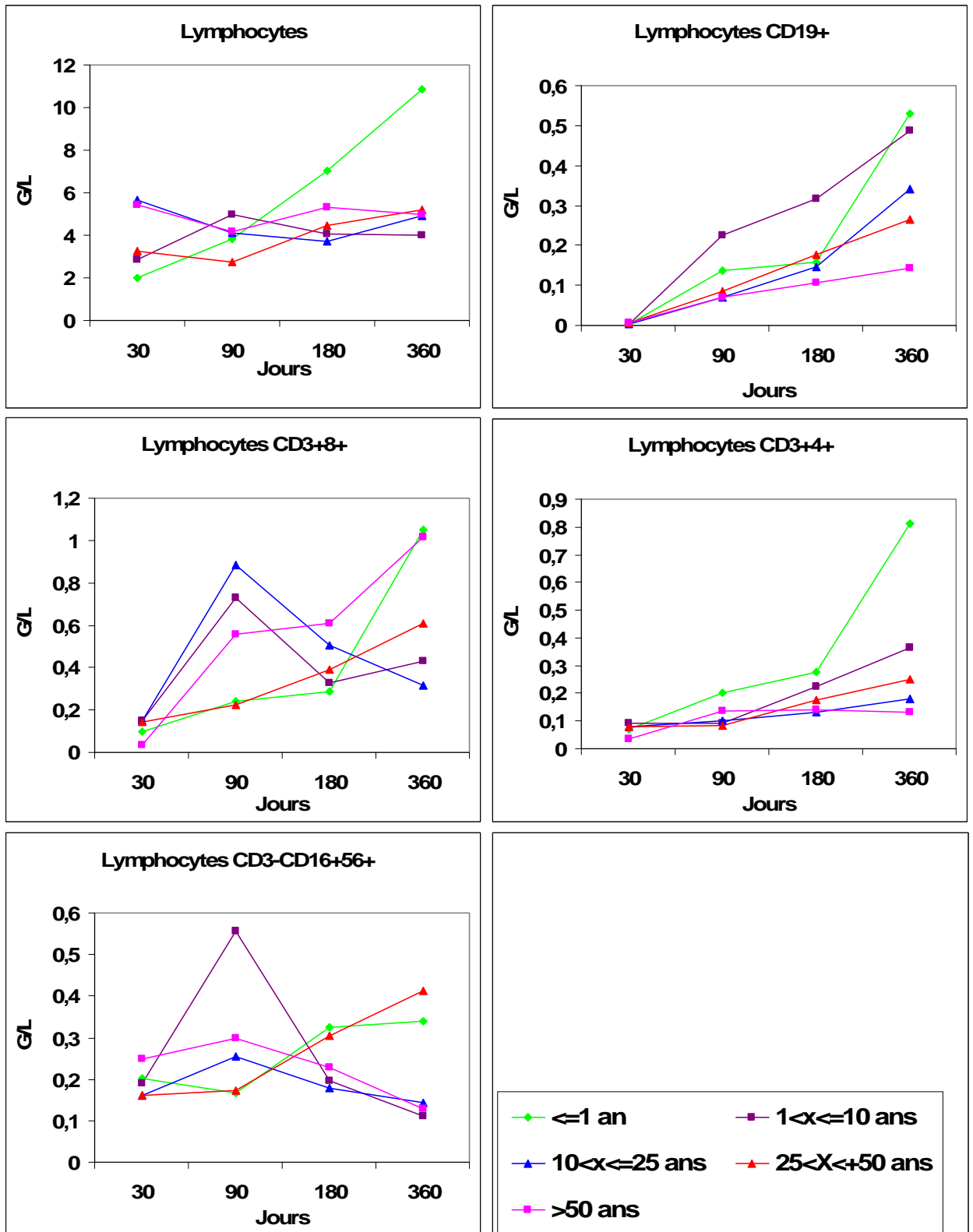


Figure 28: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de l'âge du receveur.

### C10 Quantité de cellules CD34+ administrée

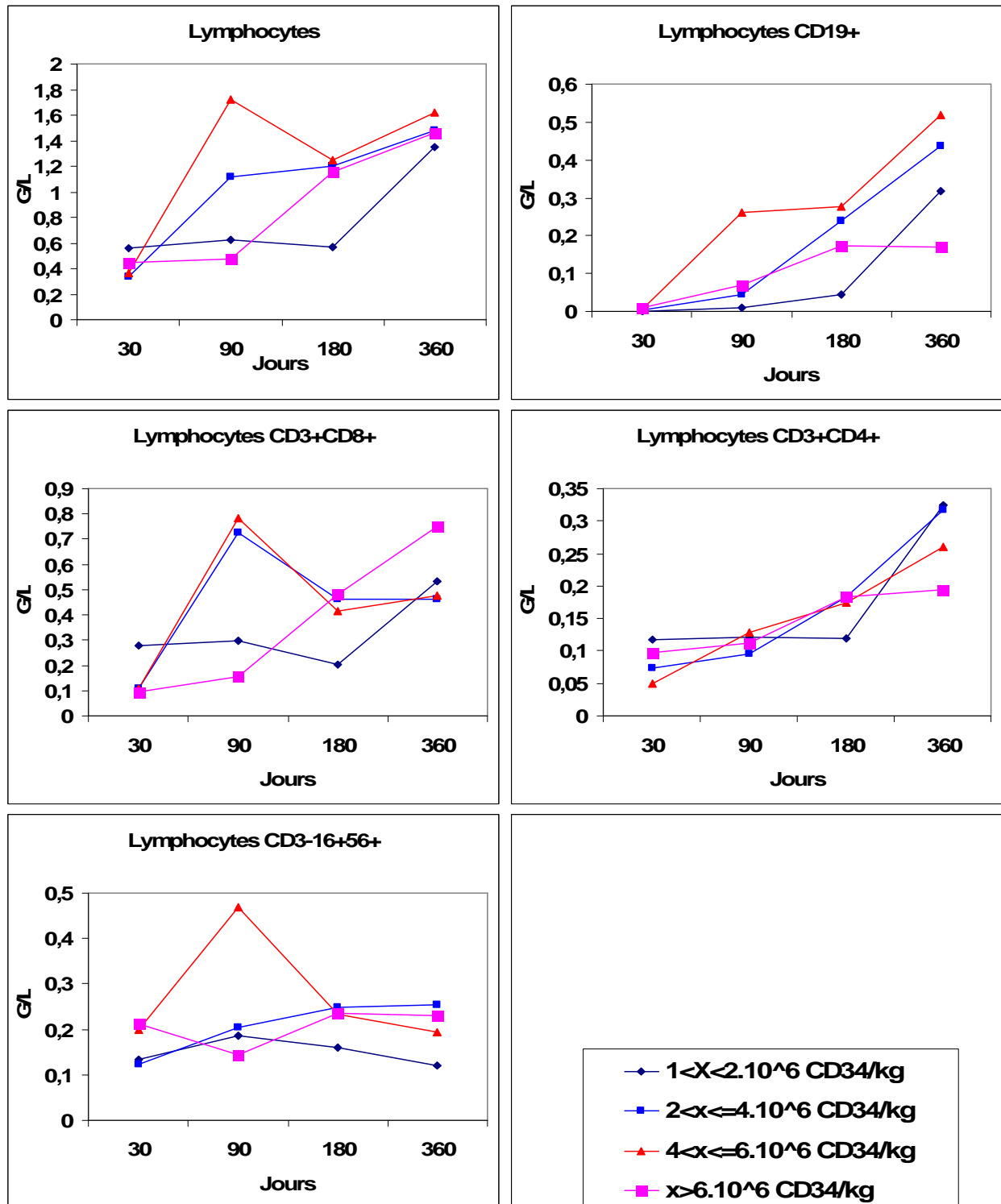


Figure 29: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction de la quantité de CD34 injectées par Kg de poids du receveur.

Le prélèvement de moelle osseuse ou le recueil CSP ne permet d'obtenir une quantité de cellules CD34<sup>+</sup> standardisée. La quantité de CSH prélevée est amenée à varier, il peut donc avoir une influence sur la reconstitution des sous populations lymphocytaires. Au sein de

notre population, nous ne constatons pas de différences significatives entre les groupes de patients répartis selon la dose de cellules CD34<sup>+</sup> administrée par kg de poids du receveur. Cependant, il semble se dégager un retard de reconstitution avec les patients ayant reçu une dose inférieure à 2.10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/Kg de receveur.

### C11 Rituximab

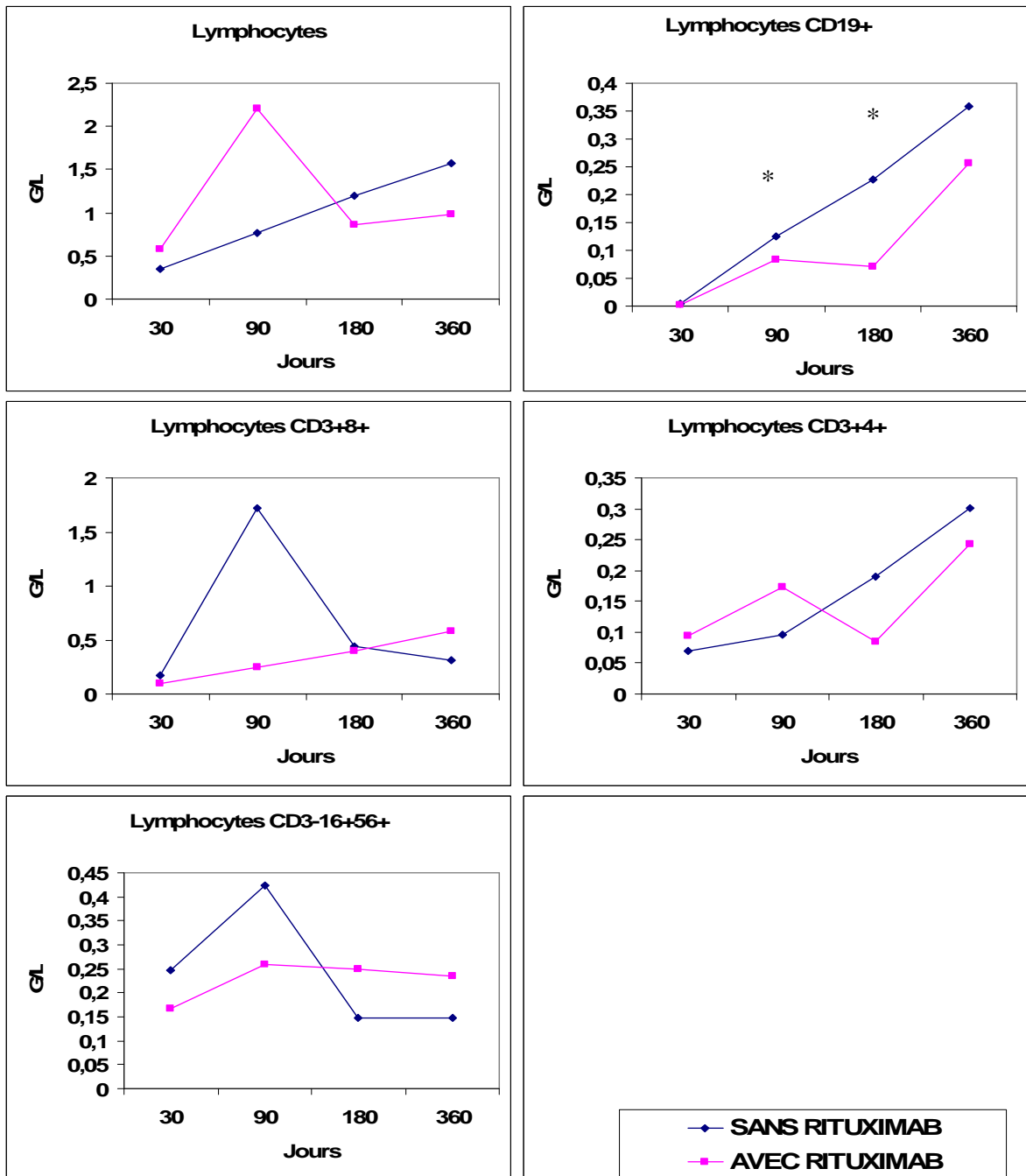


Figure 30: Reconstitution des sous populations lymphocytaires au cours de la première année en fonction du rituximab

\*  $p < 0,05$

Le rituximab est un anticorps monoclonal anti-CD20, un antigène membranaire présent sur tous les lymphocytes B (Pan-B), développé initialement pour le traitement des lymphomes B CD20+. Cet anticorps est un anticorps utilisé dans les suites de l'allogreffe pour le traitement des lymphomes post-transplantation chez les patients immunodéprimés. En général, le traitement est administré suite à une infection ou une réactivation du virus d'Epstein Barr. Des charges virales supérieures souvent à 10 000 copies/mL de sang sont associées à un processus lymphomateux en cours de développement. L'apparition de ce traitement a permis de limiter le développement de syndromes lymphoprolifératifs B post transplantation. L'impact de ce traitement n'est visible que sur la population cible de l'anticorps, les lymphocytes B. L'emploi de cette thérapeutique affecte la reconstitution en retardant le retour à un niveau quasi physiologique, notamment durant la période où il est le plus couramment administré, c'est-à-dire dans les 6 premiers mois post allogreffe.

Par ailleurs, cette thérapeutique est utile pour les GvH cortico-résistantes.

## **VII. Conclusions et perspectives**

L'analyse des sous populations lymphocytaires nous a permis de mettre en œuvre une comparaison de quelques données avec celles existantes dans la littérature. Différents facteurs semblent influencer sur la bonne reconstitution des sous populations lymphocytaires, ces différents facteurs influençant plus ou moins certaines sous populations.

Nous avons pu constater que le conditionnement influe peu sur la reconstitution immunitaire, à l'exception peut-être de l'irradiation corporelle totale, qui semble retarder le développement des lymphocytes B. La prophylaxie de la GvH semble aussi être à l'origine de désordres dans la reconstitution B, notamment l'association ciclosporine-méthotrexate. A l'inverse, l'emploi de sérum antilymphocytaire, à l'exception du rituximab, semble améliorer la reconstitution B. Le rituximab, induit par contre un retard dans la reconstitution lymphocytaire B. Au sein de cette étude, nous n'avons pas d'arguments pour un impact de l'origine du greffon (familial ou volontaire) ou d'une incompatibilité HLA sur un locus. Les patients greffés par un greffon de type CSP semble avoir une reconstitution des sous-populations lymphocytaires B et NK altérée. L'association entre type de greffon et origine du donneur nous révèle une moins bonne reconstitution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à J360 pour les greffons de moelle osseuse non apparentée. La GvH et/ou son traitement influe de manière importante sur la reconstitution lymphocytaire B, notamment au cours des 180 premiers jours. L'intensité de la GvH semble associée à une moins bonne reconstitution. L'infection à CMV et les sérologies pré-greffe témoignent d'une meilleure reconstitution CD8<sup>+</sup> chez les patients ayant présenté une infection, le risque d'infection étant d'autant plus élevé que le receveur est séropositif pour ce virus. Enfin, il apparaît que plus le donneur est jeune, et surtout, plus le receveur est jeune, plus les sous-populations lymphocytaires se reconstituent vite. Enfin, la quantité de cellules CD34<sup>+</sup> injectée au patient n'influence pas la reconstitution des sous populations lymphocytaires, à l'exception des patients greffés avec de moins de 2.10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg de receveur qui présentent une reconstitution plus lente. Cependant, cette étude sur un échantillon faible et incomplètement suivi ne permet pas d'effectuer d'analyse multivariée de ces différents paramètres.

Il apparaît donc que la population cellulaire la plus sensible à l'ensemble de ces paramètres est la population des lymphocytes B. Sensibles à l'origine du prélèvement, au conditionnement, à la GvH, au traitement de celle-ci et à sa prophylaxie, à l'âge, les lymphocytes B varient beaucoup. Ces cellules ont été peu étudiées dans le cadre de la greffe

de moelle mais elles témoignent d'un regain d'importance depuis l'utilisation d'une thérapeutique antilymphocytaire B dans les GvH réfractaires au traitement et la découverte des anticorps circulants contre les antigènes mineurs. Cependant, les techniques que nous avons employées ne permettent pas de différencier les différents types de cellules B : cellules B1, B2 naïves et mémoires, lymphocytes B de la zone marginale. Différentes études portant sur l'implication des lymphocytes B dans la maladie du greffon contre l'hôte sont intéressantes. En effet, une équipe a mis en évidence une relation entre la quantité de lymphocytes B présents dans le greffon et l'incidence de la GvH aigüe<sup>99</sup>. Un autre travail, sur l'utilisation de la photophorèse extracorporelle dans le cadre du traitement d'une GvH chronique réfractaire aux corticoïdes, nous montre que la proportion de lymphocytes B immatures CD19<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> est un facteur prédictif de non réponse à cette thérapeutique<sup>104</sup>. Une autre équipe s'est intéressée à la lymphopénie B persistante chez le patient atteint de GvH chronique active. Cette lymphopénie, sans qu'on sache si elle est la cause ou la conséquence du mécanisme, semble influencer sur l'homéostasie des lymphocytes B, favorisant leur survie en présence d'une GvH chronique active. La lymphopénie B associée à un excès de BAFF (B cell activating factor) permet de favoriser la survie de cellules B déjà activées (allo- et auto-réactive), favorisant ainsi une immunité humorale active<sup>105</sup> et inhibant leur apoptose<sup>94</sup>. Par ailleurs, une quantité importante de cellules progénitrices des lymphocytes B (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) dans le greffon est associée à un risque moins important de GvH aigüe<sup>106</sup>. Enfin, cette lymphopénie peut être favorisée par la sécrétion d'interféron  $\gamma$  par les lymphocytes T activées suite au conditionnement<sup>91</sup>.

Ces résultats variables sur l'observation des lymphocytes B dans la prévention ou la pathogénèse de la GvH nécessitent donc une observation plus fine des différentes sous-populations et des facteurs influençant leur reconstitution ainsi que d'un échantillon beaucoup plus grand.

Au cours de la GvH, les plasmocytes sécrètent des anticorps vis-à-vis d'antigènes mineurs<sup>105,107</sup> Mais il n'a pas été mis en évidence un lien direct dans la manifestation de la GvH et ces anticorps. Les lymphocytes B sont aussi des cellules régulatrices de la réponse immunitaire par leur capacité de présentation de l'antigène, et de sécrétion de cytokines. Les lymphocytes B sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), mais certaines sous-populations sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ ) et ont la capacité d'attirer et de favoriser l'expansion des cellules T régulatrices<sup>94</sup>. Ces différents rôles attribués aux lymphocytes B concourent probablement à la complexité de la

maladie et de son étude. Enfin, le résultat d'amélioration de la reconstitution lymphocytaire B chez les patients ayant reçu un sérum antilymphocytaire est encourageant dans ce sens. En effet, bien qu'il soit administré dans un but de limiter la GvH, notamment les fonctions régulées par les cellules T, nous sommes amenés à nous poser cette question également pour son impact sur les cellules B. Cet impact est globalement multifactoriel, l'effet sur les lymphocytes B résulte probablement d'une meilleure lymphopoïèse liée à une GvH moins présente, bien que le bénéfice se retrouve chez les patients atteints de GvH aigüe ou chronique. Le SAL peut avoir un effet de déplétion B initial limitant l'implication des cellules lymphocytaires B dans les premières phases de la maladie et limitant ainsi par la suite la GvH. Par ailleurs, l'administration préemptive de rituximab à la greffe semble avoir un effet bénéfique sur l'incidence de la GvH, alors que son administration plus tardive permet de limiter la maladie sans diminuer son incidence<sup>108</sup>. La déplétion B précoce (au moment de la greffe) pourrait à l'avenir devenir un outil intéressant dans la prévention de la GvH mais des études complémentaires sur l'implication de ces cellules dans la GvH sont encore nécessaires afin de mieux identifier les populations cibles intéressantes<sup>95</sup>. Enfin, les lymphocytes B ont un rôle dans la tolérance au cancer. Les cellules tumorales peuvent exprimer le CD40L, provoquant la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B. L'injection de certaines tumeurs à des souris déficientes en lymphocytes B ne permet pas l'implantation de celles-ci, alors qu'elles s'implantent chez la souris normales. L'immunité antitumorale induite par l'interféron  $\gamma$  est inhibée par la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B. L'utilisation d'une thérapeutique adjuvante anti lymphocyte B pourrait se révéler intéressante. Néanmoins, la sécrétion d'IL-10 pourrait inhiber l'angiogenèse.<sup>109,110</sup>. Des études supplémentaires sont encore à réaliser dans l'exploration de l'ontogénie des cellules régulatrices et dans leur implication dans la régulation de divers processus immunitaires.

Ainsi, le développement de la nouvelle plate-forme de cytomique du CHU de Nancy pourrait être un point initial au développement d'un projet de recherche clinique et biologique prospectif sur la recherche de sous populations lymphocytaires B, T, NK rares chez les patients en suite d'allogreffe. Le but de ce projet, outre l'identification de nouveaux marqueurs biologiques prédictifs de la GvH, permettrait de mieux comprendre l'ontogénie des populations lymphocytaires chez le patient allogreffé et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la survie et la qualité de vie de patient traité par allogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Ce type d'étude permettrait également d'envisager une



thérapeutique cellulaire d'avenir par production de cellules immunomodulatrices *in vitro*, projet existant déjà pour les cellules T régulatrices et les cellules souches mésenchymateuses.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Najman A, Verdi E, Potron G, and Isnard F. *Hématologie*. 1970. 1ère Edition .Ellipses.Paris
2. Weissman, I. L. and Shizuru, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008. 112(9):3543-3553.
3. Cheng, J., Baumhueter, S., Cacalano, G., Carver-Moore, K., Thibodeaux, H., Thomas, R., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Hague, N., Moore, M., and Lasky, L. A. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood*. 1996. 87(2):479-490.
4. Hao, Q. L., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., and Crooks, G. M. In vitro identification of single CD34+. *Blood*. 1998. 91(11):4145-4151.
5. Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M., and Loken, M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+. *Blood*. 1991. 77(6):1218-1227.
6. Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., and Shaper, J. H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J.Immunol*. 1984. 133(1):157-165.
7. Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M., and Bhatia, M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000. 95(9):2813-2820.
8. Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D. F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S. A., Sieff, C. A., Mulligan, R. C., and Johnson, R. P. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat.Med*. 1997. 3(12):1337-1345.
9. Giebel, B. and Beckmann, J. Asymmetric cell divisions of human hematopoietic stem and progenitor cells meet endosomes. *Cell Cycle*. 2007. 6(18):2201-2204.
10. Wilson, A. and Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat.Rev.Immunol*. 2006. 6(2):93-106.

11. Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben Hur, H., Many, A., Shultz, L., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., and Lapidot, T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999. 283(5403):845-848.
12. Nervi, B., Link, D. C., and DiPersio, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J.Cell Biochem*. 2006. 99(3):690-705.
13. Carstanjen, D., Ulbricht, N., Iacone, A., Regenfus, M., and Salama, A. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF. *Transfusion*. 2002. 42(5):588-596.
14. Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, J. F., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W., and Louache, F. Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4<sup>-/-</sup> chimeric mice. *Blood*. 2006. 107(6):2243-2251.
15. Solanilla, A., Grosset, C., Duchez, P., Legembre, P., Pitard, V., Dupouy, M., Belloc, F., Viillard, J. F., Reiffers, J., Boiron, J. M., Coulombel, L., and Ripoche, J. Flt3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism. *Br.J.Haematol*. 2003. 120(5):782-786.
16. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978. 4(1-2):7-25.
17. Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., and Li, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003. 425(6960):836-841.
18. Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., and Morrison, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005. 121(7):1109-1121.
19. Theilgaard-Monch, K., Raaschou-Jensen, K., Palm, H., Schjodt, K., Heilmann, C., Vindelov, L., Jacobsen, N., and Dickmeiss, E. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant*. 2001. 28(11):1073-1082.
20. Abrahamsen, I. W., Somme, S., Heldal, D., Egeland, T., Kvale, D., and Tjonnfjord, G. E. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: the impact of stem cell source and graft-versus-host disease. *Haematologica*. 2005. 90(1):86-93.
21. Storek, J., Dawson, M. A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D. G., Marr, K. A., Witherspoon, R. P., Bensinger, W., Flowers, M. E., Martin, P., Storb, R., Appelbaum, F. R., and Boeckh, M. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001. 97(11):3380-3389.

22. Clave, E., Busson, M., Douay, C., Peffault, de Latour, Berrou, J., Rabian, C., Carmagnat, M., Rocha, V., Charron, D., Socie, G., and Toubert, A. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009. 113(25):6477-6484.
23. Verneris, M. R. and Miller, J. S. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br.J.Haematol*. 2009. 147(2):185-191.
24. Brown, J. A. and Boussiotis, V. A. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin.Immunol*. 2008. 127(3):286-297.
25. The European group for Blood and bone Marrow Transplantation. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation 5th Edition*. 2008. 5th Edition
26. Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., and Sipkins, D. A. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008. 322(5909):1861-1865.
27. Petersen, S. L., Ryder, L. P., Bjork, P., Madsen, H. O., Heilmann, C., Jacobsen, N., Sengelov, H., and Vindelov, L. L. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003. 32(1):65-72.
28. Katsura, Y. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat.Rev.Immunol*. 2002. 2(2):127-132.
29. Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995. 3(4):459-473.
30. Hao, Q. L., Zhu, J., Price, M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W., and Crooks, G. M. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*. 2001. 97(12):3683-3690.
31. Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A. L., Baillou, C., Lemoine, F. M., Gluckman, J. C., Pflumio, F., and Canque, B. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood*. 2004. 104(13):3918-3926.
32. Canque, B., Camus, S., Dalloul, A., Kahn, E., Yagello, M., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Schmitt, C., and Gluckman, J. C. Characterization of dendritic cell differentiation pathways from cord blood CD34(+)CD7(+)CD45RA(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2000. 96(12):3748-3756.

33. Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 1994. 265(5178):1573-1577.
34. Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., and Nutt, S. L. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J.Exp.Med*. 2005. 201(9):1487-1502.
35. Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*. 1994. 79(1):143-156.
36. LeBien, T. W. Fates of human B-cell precursors. *Blood*. 2000. 96(1):9-23.
37. LeBien, T. W. and Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008. 112(5):1570-1580.
38. Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K., and Hardy, R. R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*. 1996. 5(6):527-535.
39. Greenbaum, S. and Zhuang, Y. Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins. *Semin.Immunol*. 2002. 14(6):405-414.
40. Lemmers, B., Gauthier, L., Guelpa-Fonlupt, V., Fougereau, M., and Schiff, C. The human (PsiL+mu-) proB complex: cell surface expression and biochemical structure of a putative transducing receptor. *Blood*. 1999. 93(12):4336-4346.
41. Hou, Y. H., Srour, E. F., Ramsey, H., Dahl, R., Broxmeyer, H. E., and Hromas, R. Identification of a human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of CXCR4. *Blood*. 2005. 105(9):3488-3492.
42. Giliani, S., Mori, L., de Saint, Basile G., Le Deist, F., Rodriguez-Perez, C., Forino, C., Mazzolari, E., Dupuis, S., Elhasid, R., Kessel, A., Galambrun, C., Gil, J., Fischer, A., Etzioni, A., and Notarangelo, L. D. Interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol.Rev*. 2005. 203:110-126.
43. Parrish, Y. K., Baez, I., Milford, T. A., Benitez, A., Galloway, N., Rogerio, J. W., Sahakian, E., Kagoda, M., Huang, G., Hao, Q. L., Sevilla, Y., Barsky, L. W., Zielinska, E., Price, M. A., Wall, N. R., Dovat, S., and Payne, K. J. IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow. *J.Immunol*. 2009. 182(7):4255-4266.
44. Rosler, E., Brandt, J., Chute, J., and Hoffman, R. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34+. *Exp.Hematol*. 2000. 28(7):841-852.

45. Xiao, M., Oppenlander, B. K., Plunkett, J. M., and Dooley, D. C. Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells. *Exp.Hematol.* 1999. 27(5):916-927.
46. Schmitt, C., Tonnelles, C., Dalloul, A., Chabannon, C., Debre, P., and Rebollo, A. Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis.* 2002. 7(3):277-284.
47. Massari, M. E., Grant, P. A., Pray-Grant, M. G., Berger, S. L., Workman, J. L., and Murre, C. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol.Cell.* 1999. 4(1):63-73.
48. Baker, S. P. and Grant, P. A. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene.* 2007. 26(37):5329-5340.
49. Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., and . E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell.* 1994. 79(5):885-892.
50. Kee, B. L. and Murre, C. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J.Exp.Med.* 1998. 188(4):699-713.
51. Bain, G., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Feeney, A. J., Sheehy, A., Schlissel, M., Shinton, S. A., Hardy, R. R., and Murre, C. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity.* 1997. 6(2):145-154.
52. Choi, J. K., Shen, C. P., Radomska, H. S., Eckhardt, L. A., and Kadesch, T. E47 activates the Ig-heavy chain and TdT loci in non-B cells. *EMBO J.* 1996. 15(18):5014-5021.
53. Fields, S., Ternyak, K., Gao, H., Ostraat, R., Akerlund, J., and Hagman, J. The 'zinc knuckle' motif of Early B cell Factor is required for transcriptional activation of B cell-specific genes. *Mol.Immunol.* 2008. 45(14):3786-3796.
54. Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat.Immunol.* 2007. 8(5):463-470.
55. Lichtman MA, Beutler E, Seligson U, Kaushansky K, and Kipps TO. Williams Hematology 7th Ed Chapter 76: Lymphopoiesis. 2007
56. Jacquot, S. and Boyer, O. [Heterogeneity and function of human B lymphocytes]. *Med.Sci.(Paris).* 2006. 22(12):1075-1080.

57. Cavazzana-Calvo, M., Six, E., Andre-Schmutz, I., and Coulombel, L. [Human hematopoiesis: from CD34 cells to T lymphocytes]. *Med.Sci.(Paris)*. 2007. 23(2):151-159.
58. Spits, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat.Rev.Immunol*. 2002. 2(10):760-772.
59. Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., and Koup, R. A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998. 396(6712):690-695.
60. Six, E. M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., and Andre-Schmutz, I. A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. *J.Exp.Med*. 2007. 204(13):3085-3093.
61. Haddad, R., Guimiot, F., Six, E., Jourquin, F., Setterblad, N., Kahn, E., Yagello, M., Schiffer, C., Andre-Schmutz, I., Cavazzana-Calvo, M., Gluckman, J. C., Delezoide, A. L., Pflumio, F., and Canque, B. Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity*. 2006. 24(2):217-230.
62. Blom, B., Verschuren, M. C., Heemskerk, M. H., Bakker, A. Q., Gastel-Mol, E. J., Wolvers-Tettero, I. L., van Dongen, J. J., and Spits, H. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood*. 1999. 93(9):3033-3043.
63. Weerkamp, F., Baert, M. R., Brugman, M. H., Dik, W. A., de Haas, E. F., Visser, T. P., de Groot, C. J., Wagemaker, G., van Dongen, J. J., and Staal, F. J. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood*. 2006. 107(8):3131-3137.
64. Dalloul, A. H., Patry, C., Salamero, J., Canque, B., Grassi, F., and Schmitt, C. Functional and phenotypic analysis of thymic CD34+CD1a- progenitor-derived dendritic cells: predominance of CD1a+ differentiation pathway. *J.Immunol*. 1999. 162(10):5821-5828.
65. Kimmig, S., Przybylski, G. K., Schmidt, C. A., Laurisch, K., Mowes, B., Radbruch, A., and Thiel, A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J.Exp.Med*. 2002. 195(6):789-794.
66. McFarland, R. D., Douek, D. C., Koup, R. A., and Picker, L. J. Identification of a human recent thymic emigrant phenotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 2000. 97(8):4215-4220.

67. Diaz, G. A. CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system? *Immunol.Rev.* 2005. 203:235-243.
68. Peschon, J. J., Morrissey, P. J., Grabstein, K. H., Ramsdell, F. J., Maraskovsky, E., Gliniak, B. C., Park, L. S., Ziegler, S. F., Williams, D. E., Ware, C. B., Meyer, J. D., and Davison, B. L. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J.Exp.Med.* 1994. 180(5):1955-1960.
69. Sleasman, J. W., Harville, T. O., White, G. B., George, J. F., Barrett, D. J., and Goodenow, M. M. Arrested rearrangement of TCR V beta genes in thymocytes from children with X-linked severe combined immunodeficiency disease. *J.Immunol.* 1994. 153(1):442-448.
70. Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity.* 1999. 10(5):547-558.
71. De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., and Plum, J. Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J.Immunol.* 2002. 169(6):3021-3029.
72. Jaleco, A. C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., and Parreira, L. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J.Exp.Med.* 2001. 194(7):991-1002.
73. Han, W., Ye, Q., and Moore, M. A. A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2000. 95(5):1616-1625.
74. Smith, E. M., Akerblad, P., Kadesch, T., Axelson, H., and Sigvardsson, M. Inhibition of EBF function by active Notch signaling reveals a novel regulatory pathway in early B-cell development. *Blood.* 2005. 106(6):1995-2001.
75. Blom, B., Heemskerk, M. H., Verschuren, M. C., van Dongen, J. J., Stegmann, A. P., Bakker, A. Q., Couwenberg, F., Res, P. C., and Spits, H. Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. *EMBO J.* 1999. 18(10):2793-2802.
76. Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature.* 1999. 401(6753):556-562.
77. Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature.* 1996. 384(6608):474-478.



78. Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., Andres-Aguayo, L., and Graf, T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*. 2006. 25(5):731-744.
79. Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., and Flavell, R. A. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity*. 2007. 27(1):89-99.
80. Seder, R. A. and Ahmed, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat.Immunol*. 2003. 4(9):835-842.
81. Berard, M. and Tough, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*. 2002. 106(2):127-138.
82. Freud, A. G. and Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development. *Immunol.Rev*. 2006. 214:56-72.
83. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood*. 2008. 112(3):461-469.
84. Veneri, D., Franchini, M., de Sabata, D., Ledro, S., Vella, A., Ortolani, R., Pizzolo, G., and Benedetti, F. Peripheral blood CD5-positive B lymphocytes (B-1a cells) after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in humans. *Blood Transfus*. 2008. 6(4):220-224.
85. Antin, J. H., Ault, K. A., Rapoport, J. M., and Smith, B. R. B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. Leu-1 antigen defines a distinct population of B lymphocytes. *J.Clin.Invest*. 1987. 80(2):325-332.
86. Revillard and ASSIM. *Immunologie*. 2009. 4ème Edition .DeBoeck Université
87. Ochs, L., Shu, X. O., Miller, J., Enright, H., Wagner, J., Filipovich, A., Miller, W., and Weisdorf, D. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood*. 1995. 86(10):3979-3986.
88. Storek, J., Joseph, A., Espino, G., Dawson, M. A., Douek, D. C., Sullivan, K. M., Flowers, M. E., Martin, P., Mathioudakis, G., Nash, R. A., Storb, R., Appelbaum, F. R., and Maloney, D. G. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2001. 98(13):3505-3512.
89. Jimenez, M., Ercilla, G., and Martinez, C. Immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens. *Leukemia*. 2007. 21(8):1628-1637.

90. Maris, M., Boeckh, M., Storer, B., Dawson, M., White, K., Keng, M., Sandmaier, B., Maloney, D., Storb, R., and Storek, J. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Exp.Hematol.* 2003. 31(10):941-952.
91. Storek, J., Wells, D., Dawson, M. A., Storer, B., and Maloney, D. G. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2001. 98(2):489-491.
92. Shearer, W. T., Rosenblatt, H. M., Gelman, R. S., Oyomopito, R., Plaeger, S., Stiehm, E. R., Wara, D. W., Douglas, S. D., Luzuriaga, K., McFarland, E. J., Yogev, R., Rathore, M. H., Levy, W., Graham, B. L., and Spector, S. A. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J.Allergy Clin.Immunol.* 2003. 112(5):973-980.
93. Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia.* 2007. 21(7):1387-1394.
94. Shimabukuro-Vornhagen, A., Hallek, M. J., Storb, R. F., and Bergwelt-Baildon, M. S. The role of B Cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood.* 2009
95. Kebriaei, P., Saliba, R. M., Ma, C., Ippoliti, C., Couriel, D. R., de Lima, M., Giralt, S., Qazilbash, M. H., Gajewski, J. L., Ha, C. S., Champlin, R. E., and Khouri, I. F. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after rituximab-containing myeloablative preparative regimen for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2006. 38(3):203-209.
96. Storek, J., Joseph, A., Dawson, M. A., Douek, D. C., Storer, B., and Maloney, D. G. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation.* 2002. 73(7):1154-1158.
97. Heining, C., Spyridonidis, A., Bernhardt, E., Schulte-Monting, J., Behringer, D., Grulich, C., Jakob, A., Bertz, H., and Finke, J. Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2007. 39(10):613-622.
98. Schmitz, N., Eapen, M., Horowitz, M. M., Zhang, M. J., Klein, J. P., Rizzo, J. D., Loberiza, F. R., Gratwohl, A., and Champlin, R. E. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2006. 108(13):4288-4290.

99. Iori, A. P., Torelli, G. F., De Propriis, M. S., Milano, F., Pupella, S., Gozzer, M., Mancini, F., Milani, M. L., Intoppa, S., Cerretti, R., Lucarelli, B., Valle, V., Malandrucolo, L., Iannella, E., Arleo, E., Guarini, A., and Foa, R. B-cell concentration in the apheretic product predicts acute graft-versus-host disease and treatment-related mortality of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation*. 2008. 85(3):386-390.
100. Scheinberg, P., Melenhorst, J. J., Brenchley, J. M., Hill, B. J., Hensel, N. F., Chattopadhyay, P. K., Roederer, M., Picker, L. J., Price, D. A., Barrett, A. J., and Douek, D. C. The transfer of adaptive immunity to cytomegalovirus (CMV) during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood*. 2009
101. Peggs, K. S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Moss, P., Goldstone, A. H., Yong, K., and Mackinnon, S. Reconstitution of T-cell repertoire after autologous stem cell transplantation: influence of CD34 selection and cytomegalovirus infection. *Biol.Blood Marrow Transplant*. 2003. 9(3):198-205.
102. Hecker, M., Qiu, D., Marquardt, K., Bein, G., and Hackstein, H. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang*. 2004. 86(1):41-44.
103. Aarnisalo, J., Ilonen, J., Vainionpaa, R., Volanen, I., Kaitosaari, T., and Simell, O. Development of antibodies against cytomegalovirus, varicella-zoster virus and herpes simplex virus in Finland during the first eight years of life: a prospective study. *Scand.J.Infect.Dis*. 2003. 35(10):750-753.
104. Kuzmina, Z., Greinix, H. T., Knobler, R., Worel, N., Kouba, M., Weigl, R., Kormoczi, U., Rottal, A., Pohlreich, D., Zielinski, C., and Pickl, W. F. Proportions of immature CD19+. *Blood*. 2009. 114(3):744-746.
105. Sarantopoulos, S., Stevenson, K. E., Kim, H. T., Cutler, C. S., Bhuiya, N. S., Schowalter, M., Ho, V. T., Alyea, E. P., Koreth, J., Blazar, B. R., Soiffer, R. J., Antin, J. H., and Ritz, J. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009. 113(16):3865-3874.
106. Michonneau, D., Peffault, de Latour, Porcher, R., Robin, M., Benbunan, M., Rocha, V., Ribaud, P., Ferry, C., Devergie, A., Vanneaux, V., Gluckman, E., Marolleau, J. P., Socie, G., and Larghero, J. Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Br.J.Haematol*. 2009. 145(1):107-114.
107. Sarantopoulos, S., Stevenson, K. E., Kim, H. T., Bhuiya, N. S., Cutler, C. S., Soiffer, R. J., Antin, J. H., and Ritz, J. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin.Cancer Res*. 2007. 13(20):6107-6114.

108. van Dorp, S., Pietersma, F., Wolfl, M., Verdonck, L. F., Petersen, E. J., Lokhorst, H. M., Martens, E., Theobald, M., van Baarle, D., Meijer, E., and Kuball, J. Rituximab treatment before reduced-intensity conditioning transplantation associates with a decreased incidence of extensive chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009. 15(6):671-678.
109. Dalloul, A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun.Rev.* 2009. 8(4):349-353.
110. Mauri, C. and Ehrenstein, M. R. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008. 29(1):34-40.

## ANNEXE

**Tableau 6: Moyenne et Ecart type (S.D.) des sous populations lymphocytaires en fonction du conditionnement**

CONDITIONNEMENT		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	MYELOABLATIF	21	0,518	0,333	15	1,439	1,920	16	1,147	0,803	13	1,594	1,137
	NON MYELOABLATIF	26	0,293	0,178	16	0,863	1,047	18	1,223	0,861	13	1,503	0,984
	AUTRE	4	0,409	0,055	4	0,416	0,400	4	0,775	0,681	3	0,869	0,773
L.B G/L	MYELOABLATIF	21	0,003	0,005	15	0,089	0,259	16	0,171	0,231	13	0,394	0,385
	NON MYELOABLATIF	26	0,006	0,009	16	0,121	0,150	18	0,205	0,234	13	0,306	0,327
	AUTRE	4	0,006	0,003	4	0,088	0,160	4	0,180	0,199	3	0,125	0,143
L. NK G/L	MYELOABLATIF	21	0,167	0,123	15	0,332	0,428	16	0,222	0,180	13	0,198	0,182
	NON MYELOABLATIF	26	0,146	0,142	16	0,219	0,160	18	0,269	0,226	13	0,257	0,341
	AUTRE	4	0,171	0,093	4	0,115	0,164	4	0,119	0,056	3	0,066	0,038
L. T 4 G/L	MYELOABLATIF	21	0,102	0,080	15	0,127	0,099	16	0,211	0,149	13	0,358	0,292
	NON MYELOABLATIF	26	0,038	0,053	16	0,108	0,132	18	0,148	0,092	13	0,150	0,092
	AUTRE	4	0,130	0,078	4	0,037	0,048	4	0,170	0,176	3	0,326	0,292
L. T 8 G/L	MYELOABLATIF	21	0,203	0,226	15	0,807	1,576	16	0,423	0,423	13	0,548	0,390
	NON MYELOABLATIF	26	0,046	0,069	16	0,379	0,728	18	0,496	0,509	13	0,608	0,618
	AUTRE	4	0,059	0,052	4	0,110	0,194	4	0,231	0,253	3	0,283	0,301

**Tableau 7 : Moyenne et Ecart type (S.D.) des sous populations lymphocytaires en fonction du conditionnement**

CONDITIONNEMENT		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	TBI 12 Gray	10	0,698	0,371	7	2,104	2,542	5	1,054	0,843	10	1,347	0,814
	Busulfan	11	0,354	0,189	8	0,856	1,000	11	1,189	0,823	3	2,416	1,859
	RIC Fludarabine Melphalan	15	0,287	0,196	10	1,069	1,276	10	1,307	0,898	8	1,494	0,706
	RIC Autre	11	0,300	0,159	6	0,519	0,363	8	1,118	0,861	5	1,517	1,425
	AUTRE	4	0,409	0,055	4	0,416	0,400	4	0,775	0,681	3	0,869	0,773
L.B G/L	TBI 12 Gray	10	0,001	0,004	7	0,007	0,010	5	0,068	0,100	10	0,347	0,402
	Busulfan	11	0,004	0,005	8	0,161	0,349	11	0,218	0,261	3	0,551	0,337
	RIC Fludarabine Melphalan	15	0,005	0,007	10	0,123	0,150	10	0,232	0,270	8	0,310	0,354
	RIC Autre	11	0,006	0,011	6	0,118	0,164	8	0,171	0,194	5	0,302	0,320
	AUTRE	4	0,006	0,003	4	0,088	0,160	4	0,180	0,199	3	0,125	0,143
L. NK G/L	TBI 12 Gray	10	0,186	0,149	7	0,324	0,475	5	0,123	0,063	10	0,175	0,142
	Busulfan	11	0,150	0,099	8	0,338	0,416	11	0,268	0,200	3	0,273	0,312
	RIC Fludarabine Melphalan	15	0,143	0,144	10	0,222	0,182	10	0,256	0,193	8	0,173	0,200
	RIC Autre	11	0,149	0,145	6	0,215	0,133	8	0,285	0,275	5	0,393	0,491
	AUTRE	4	0,171	0,093	4	0,115	0,164	4	0,119	0,056	3	0,066	0,038
L. T 4 G/L	TBI 12 Gray	10	0,127	0,092	7	0,119	0,083	5	0,159	0,115	10	0,283	0,181
	Busulfan	11	0,078	0,062	8	0,134	0,117	11	0,235	0,161	3	0,610	0,491
	RIC Fludarabine Melphalan	15	0,036	0,043	10	0,131	0,161	10	0,171	0,086	8	0,174	0,104
	RIC Autre	11	0,041	0,067	6	0,070	0,055	8	0,118	0,097	5	0,111	0,062
	AUTRE	4	0,130	0,078	4	0,037	0,048	4	0,170	0,176	3	0,326	0,292
L. T 8 G/L	TBI 12 Gray	10	0,328	0,269	7	1,551	2,137	5	0,630	0,728	10	0,467	0,318
	Busulfan	11	0,089	0,083	8	0,157	0,135	11	0,328	0,159	3	0,820	0,560
	RIC Fludarabine Melphalan	15	0,046	0,075	10	0,531	0,897	10	0,559	0,596	8	0,631	0,680
	RIC Autre	11	0,046	0,062	6	0,127	0,138	8	0,419	0,399	5	0,572	0,578
	AUTRE	4	0,059	0,052	4	0,110	0,194	4	0,231	0,253	3	0,283	0,301

**Tableau 8 : Moyenne et Ecart type des sous-population lymphocytaire en fonction de la prophylaxie de la GvH**

PROPHYLAXIE GvH		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	CSA	4	0,331	0,221	4	0,684	0,380	4	1,323	0,667	4	1,914	0,208
	CSA MTX	18	0,479	0,300	12	1,522	2,178	15	0,985	0,792	11	1,040	0,802
	CSA MMF	28	0,318	0,178	18	0,844	0,981	19	1,231	0,868	13	1,706	1,275
L.B G/L	CSA	4	0,006	0,005	4	0,169	0,179	4	0,326	0,209	4	0,687	0,329
	CSA MTX	18	0,002	0,004	12	0,089	0,289	15	0,147	0,232	11	0,226	0,314
	CSA MMF	28	0,006	0,008	18	0,104	0,137	19	0,191	0,220	13	0,314	0,331
L. NK G/L	CSA	4	0,115	0,092	4	0,163	0,135	4	0,168	0,030	4	0,133	0,132
	CSA MTX	18	0,178	0,124	12	0,380	0,468	15	0,179	0,146	11	0,160	0,139
	CSA MMF	28	0,151	0,140	18	0,201	0,164	19	0,290	0,238	13	0,280	0,357
L. T 4 G/L	CSA	4	0,079	0,119	4	0,059	0,040	4	0,217	0,176	4	0,412	0,199
	CSA MTX	18	0,092	0,075	12	0,089	0,092	15	0,170	0,133	11	0,235	0,173
	CSA MMF	28	0,051	0,060	18	0,127	0,135	19	0,174	0,120	13	0,235	0,298
L. T 8 G/L	CSA	4	0,099	0,127	4	0,246	0,190	4	0,531	0,375	4	0,583	0,080
	CSA MTX	18	0,164	0,172	12	0,899	1,769	15	0,383	0,443	11	0,355	0,289
	CSA MMF	28	0,051	0,067	18	0,351	0,686	19	0,460	0,486	13	0,673	0,661

**Tableau 9: moyenne et écart type des sous-populations lymphocytaires en fonction d'un conditionnement avec SAL**

SAL		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	NON	9	0,395	0,208	6	0,586	0,298	6	0,873	0,807	5	1,623	0,631
	OUI	41	0,398	0,285	29	1,156	1,591	31	1,202	0,827	23	1,427	1,121
L.B G/L	NON	9	0,003	0,005	6	0,005	0,012	6	0,023	0,028	5	0,247	0,223
	OUI	41	0,005	0,007	29	0,124	0,215	31	0,214	0,234	23	0,311	0,334
L. NK G/L	NON	9	0,199	0,161	6	0,170	0,195	6	0,151	0,142	5	0,096	0,076
	OUI	41	0,146	0,123	29	0,273	0,326	31	0,250	0,207	23	0,245	0,280
L. T 4 G/L	NON	9	0,083	0,046	6	0,100	0,057	6	0,168	0,056	5	0,245	0,093
	OUI	41	0,070	0,080	29	0,110	0,122	31	0,178	0,140	23	0,276	0,260
L. T 8 G/L	NON	9	0,080	0,075	6	0,283	0,331	6	0,461	0,528	5	0,950	0,674
	OUI	41	0,121	0,186	29	0,584	1,254	31	0,444	0,447	23	0,484	0,417



**Tableau 10: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'origine du donneur chez des patients greffé 10/10<sup>ème</sup>**

ORIGINE		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	Apparenté	19	0,383	0,282	17	0,704	0,737	15	1,245	0,833	15	1,662	1,041
	Non Apparenté	22	0,432	0,293	13	1,685	2,155	17	1,175	0,918	8	1,381	1,327
L.B G/L	Apparenté	19	0,003	0,005	17	0,116	0,252	15	0,186	0,220	15	0,337	0,342
	Non Apparenté	22	0,005	0,008	13	0,061	0,094	17	0,188	0,245	8	0,285	0,367
L. NK G/L	Apparenté	19	0,134	0,134	17	0,194	0,304	15	0,218	0,202	15	0,199	0,184
	Non Apparenté	22	0,180	0,132	13	0,324	0,353	17	0,250	0,229	8	0,302	0,423
L. T 4 G/L	Apparenté	19	0,088	0,079	17	0,108	0,070	15	0,229	0,142	15	0,331	0,289
	Non Apparenté	22	0,074	0,078	13	0,135	0,163	17	0,150	0,124	8	0,193	0,167
L. T 8 G/L	Apparenté	19	0,127	0,204	17	0,255	0,233	15	0,481	0,382	15	0,691	0,538
	Non Apparenté	22	0,115	0,167	13	1,064	1,785	17	0,478	0,560	8	0,471	0,514

**Tableau 11 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'identité HLA chez les patients non apparentés**

HLA		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	"10/10"	22	0,432	0,293	13	1,685	2,155	17	1,175	0,918	8	1,381	1,327
	"9/10"	10	0,334	0,183	5	0,635	0,311	6	0,802	0,227	6	1,148	0,421
L.B G/L	"10/10"	22	0,005	0,008	13	0,061	0,094	17	0,188	0,245	8	0,285	0,367
	"9/10"	10	0,005	0,007	5	0,171	0,220	6	0,193	0,209	6	0,356	0,371
L. NK G/L	"10/10"	22	0,180	0,132	13	0,324	0,353	17	0,250	0,229	8	0,302	0,423
	"9/10"	10	0,147	0,116	5	0,283	0,169	6	0,227	0,074	6	0,118	0,088
L. T 4 G/L	"10/10"	22	0,074	0,078	13	0,135	0,163	17	0,150	0,124	8	0,193	0,167
	"9/10"	10	0,034	0,048	5	0,037	0,024	6	0,122	0,038	6	0,180	0,123
L. T 8 G/L	"10/10"	22	0,115	0,167	13	1,064	1,785	17	0,478	0,560	8	0,471	0,514
	"9/10"	10	0,073	0,105	5	0,093	0,074	6	0,213	0,137	6	0,294	0,205

**Tableau 12: Moyenne et écart type des sous population en fonction du type de greffe et de son origine**

GREFFE		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	MO	28	0,396	0,275	19	1,084	1,416	24	1,181	0,849	22	1,522	1,023
	CSP	23	0,392	0,267	15	1,071	1,613	13	1,138	0,767	7	1,340	1,117
L.B G/L	MO	28	0,004	0,008	19	0,123	0,242	24	0,218	0,250	22	0,360	0,331
	CSP	23	0,005	0,006	15	0,086	0,144	13	0,142	0,174	7	0,222	0,385
L. NK G/L	MO	28	0,149	0,118	19	0,254	0,301	24	0,269	0,232	22	0,247	0,287
	CSP	23	0,165	0,144	15	0,250	0,336	13	0,171	0,102	7	0,096	0,077
L. T 4 G/L	MO	28	0,075	0,081	19	0,098	0,093	24	0,176	0,135	22	0,280	0,256
	CSP	23	0,066	0,068	15	0,128	0,136	13	0,189	0,116	7	0,203	0,175
L. T 8 G/L	MO	28	0,130	0,185	19	0,555	1,260	24	0,400	0,414	22	0,491	0,402
	CSP	23	0,089	0,152	15	0,538	1,076	13	0,538	0,519	7	0,725	0,725

GREFFE		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	MO APP	14	0,384	0,304	11	0,908	0,849	10	1,335	0,839	11	1,819	1,014
	CSP APP	5	0,381	0,240	6	0,330	0,188	5	1,066	0,884	4	1,229	1,132
	MO N. APP	14	0,409	0,253	8	1,325	2,002	14	1,070	0,869	11	1,224	0,986
	CSP N. APP	18	0,396	0,280	9	1,566	1,961	8	1,184	0,746	3	1,488	1,328
L. B G/L	MO APP	14	0,003	0,004	11	0,172	0,303	10	0,258	0,239	11	0,439	0,344
	CSP APP	5	0,004	0,007	6	0,014	0,020	5	0,040	0,041	4	0,057	0,079
	MO N. APP	14	0,004	0,010	8	0,055	0,102	14	0,189	0,262	11	0,281	0,312
	CSP N. APP	18	0,006	0,006	9	0,134	0,171	8	0,205	0,198	3	0,442	0,554
L. NK G/L	MO APP	14	0,111	0,091	11	0,236	0,374	10	0,251	0,222	11	0,235	0,199
	CSP APP	5	0,198	0,217	6	0,118	0,071	5	0,152	0,152	4	0,100	0,089
	MO N. APP	14	0,188	0,132	8	0,279	0,177	14	0,283	0,246	11	0,259	0,364
	CSP N. APP	18	0,156	0,124	9	0,339	0,415	8	0,184	0,064	3	0,091	0,078
L. T4 G/L	MO APP	14	0,087	0,080	11	0,107	0,075	10	0,253	0,158	11	0,410	0,300
	CSP APP	5	0,088	0,085	6	0,110	0,067	5	0,181	0,100	4	0,113	0,071
	MO N. APP	14	0,063	0,082	8	0,084	0,118	14	0,122	0,085	11	0,151	0,104
	CSP N. APP	18	0,060	0,064	9	0,140	0,171	8	0,195	0,131	3	0,322	0,216
L. T8 G/L	MO APP	14	0,152	0,233	11	0,332	0,256	10	0,422	0,270	11	0,620	0,362
	CSP APP	5	0,058	0,043	6	0,113	0,068	5	0,601	0,565	4	0,884	0,918
	MO N. APP	14	0,107	0,124	8	0,861	1,950	14	0,385	0,502	11	0,363	0,415
	CSP N. APP	18	0,098	0,170	9	0,821	1,341	8	0,500	0,525	3	0,513	0,440

**Tableau 13: Moyenne et écart type des sous populations lymphocytaires en fonction de la GvH aigüe**

GvH aigüe		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	NON	16	0,361	0,273	10	1,046	1,240	11	1,466	0,907	8	1,629	1,040
	OUI	35	0,410	0,269	25	1,064	1,570	27	1,012	0,746	21	1,420	1,044
L.B G/L	NON	16	0,007	0,010	10	0,199	0,159	11	0,310	0,260	8	0,314	0,251
	OUI	35	0,003	0,005	25	0,065	0,205	27	0,138	0,192	21	0,332	0,377
		0			0			0			0		
L. NK G/L	NON	16	0,166	0,072	10	0,220	0,170	11	0,274	0,281	8	0,325	0,419
	OUI	35	0,152	0,149	25	0,270	0,350	27	0,217	0,155	21	0,167	0,160
L. T 4 G/L	NON	16	0,055	0,069	10	0,118	0,150	11	0,186	0,111	8	0,268	0,176
	OUI	35	0,079	0,077	25	0,104	0,098	27	0,173	0,136	21	0,259	0,262
L. T 8 G/L	NON	16	0,092	0,221	10	0,480	0,881	11	0,570	0,499	8	0,582	0,454
	OUI	35	0,120	0,144	25	0,553	1,259	27	0,383	0,428	21	0,535	0,519

GvH aigüe		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	ABSENCE	16	0,361	0,273	10	1,046	1,240	11	1,466	0,907	8	1,629	1,040
	GRADE 1-2	32	0,398	0,270	23	1,104	1,632	26	1,036	0,751	19	1,515	1,049
	GRADE 3-4	3	0,534	0,269	2	0,595	0,231	1	0,399		2	0,525	0,464
L.B G/L	ABSENCE	16	0,007	0,010	10	0,199	0,159	11	0,310	0,260	8	0,314	0,251
	GRADE 1-2	32	0,004	0,005	23	0,071	0,213	26	0,143	0,194	19	0,357	0,387
	GRADE 3-4	3	0,000	0,000	2	0,002	0,003	1	0,008		2	0,091	0,114
L. NK G/L	ABSENCE	16	0,166	0,072	10	0,220	0,170	11	0,274	0,281	8	0,325	0,419
	GRADE 1-2	32	0,154	0,155	23	0,265	0,359	26	0,221	0,156	19	0,176	0,166
	GRADE 3-4	3	0,125	0,087	2	0,326	0,321	1	0,108		2	0,085	0,035
L. T 4 G/L	ABSENCE	16	0,055	0,069	10	0,118	0,150	11	0,186	0,111	8	0,268	0,176
	GRADE 1-2	32	0,069	0,066	23	0,103	0,100	26	0,177	0,137	19	0,274	0,270
	GRADE 3-4	3	0,187	0,114	2	0,119	0,082	1	0,072		2	0,119	0,134
L. T 8 G/L	ABSENCE	16	0,092	0,221	10	0,480	0,881	11	0,570	0,499	8	0,582	0,454
	GRADE 1-2	32	0,114	0,143	23	0,591	1,308	26	0,390	0,435	19	0,569	0,532
	GRADE 3-4	3	0,190	0,165	2	0,110	0,016	1	0,207		2	0,210	0,233

**Tableau 14: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction du traitement de la GvH aigüe**

TRAITEMENT		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	absence	1	0,787		2	1,841	1,991	2	2,661	0,285	1	2,455	
	GC	18	0,415	0,282	12	1,036	1,487	14	1,011	0,616	13	1,586	1,187
	GC/ZENAPAX	14	0,372	0,216	10	0,978	1,808	11	0,715	0,554	7	0,964	0,578
L.B G/L	absence	1	0,016		2	0,519	0,691	2	0,381	0,433	1	0,172	
	GC	18	0,002	0,004	12	0,029	0,068	14	0,188	0,192	13	0,480	0,412
	GC/ZENAPAX	14	0,004	0,005	10	0,025	0,062	11	0,031	0,031	7	0,080	0,090
L. NK G/L	absence	1	0,575		2	0,753	0,820	2	0,538	0,170	1	0,221	
	GC	18	0,149	0,130	12	0,268	0,358	14	0,227	0,148	13	0,160	0,156
	GC/ZENAPAX	14	0,138	0,142	10	0,169	0,180	11	0,146	0,068	7	0,173	0,190
L. T 4 G/L	absence	1	0,063		2	0,157	0,165	2	0,295	0,174	1	0,196	
	GC	18	0,076	0,084	12	0,107	0,091	14	0,199	0,157	13	0,326	0,312
	GC/ZENAPAX	14	0,075	0,052	10	0,097	0,105	11	0,118	0,076	7	0,144	0,096
L. T 8 G/L	absence	1	0,094		2	0,262	0,203	2	0,904	0,774	1	1,620	
	GC	18	0,132	0,172	12	0,544	0,973	14	0,317	0,265	13	0,463	0,424
	GC/ZENAPAX	14	0,097	0,093	10	0,651	1,740	11	0,374	0,514	7	0,513	0,575

**Tableau 15: Moyenne et écart-type des sous-populations lymphocytaires en fonction du développement d'une GvH chronique**

GvH chronique		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	NON	19	0,406	0,283	13	0,822	0,803	15	1,412	0,900	12	1,517	0,944
	OUI	31	0,390	0,268	21	1,203	1,790	23	0,969	0,714	17	1,450	1,112
L.B G/L	NON	19	0,005	0,009	13	0,186	0,281	15	0,280	0,277	12	0,263	0,219
	OUI	31	0,003	0,005	21	0,035	0,068	23	0,128	0,162	17	0,372	0,409
L. NK G/L	NON	19	0,193	0,133	13	0,277	0,341	15	0,318	0,254	12	0,288	0,339
	OUI	31	0,132	0,125	21	0,238	0,300	23	0,179	0,128	17	0,157	0,177
L. T 4 G/L	NON	19	0,060	0,067	13	0,082	0,076	15	0,184	0,121	12	0,233	0,149
	OUI	31	0,080	0,079	21	0,127	0,131	23	0,172	0,135	17	0,282	0,288
L. T 8 G/L	NON	19	0,101	0,204	13	0,250	0,282	15	0,470	0,401	12	0,609	0,502
	OUI	31	0,121	0,151	21	0,725	1,452	23	0,416	0,488	17	0,505	0,500

**Tableau 16 : Moyenne et écart-type des sous-populations lymphocytaires en fonction de la sérologie CMV**

SERO CMV		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	D+/R+	15	0,483	0,390	9	1,582	1,957	8	1,751	0,904	8	2,543	1,127
	D+/R-	9	0,305	0,208	9	0,440	0,262	9	0,628	0,448	5	1,099	0,620
	D-/R+	10	0,343	0,230	8	1,822	1,992	9	1,437	0,966	6	1,166	0,884
	D-/R-	17	0,394	0,166	9	0,476	0,216	12	0,906	0,499	10	1,003	0,542
L. B G/L	D+/R+	15	0,005	0,010	9	0,042	0,051	8	0,189	0,139	8	0,550	0,399
	D+/R-	9	0,003	0,006	9	0,037	0,109	9	0,135	0,206	5	0,245	0,224
	D-/R+	10	0,005	0,007	8	0,302	0,334	9	0,305	0,345	6	0,249	0,341
	D-/R-	17	0,004	0,004	9	0,056	0,085	12	0,139	0,154	10	0,236	0,305
L. NK G/L	D+/R+	15	0,150	0,137	9	0,307	0,422	8	0,339	0,311	8	0,333	0,415
	D+/R-	9	0,127	0,128	9	0,182	0,135	9	0,169	0,068	5	0,115	0,061
	D-/R+	10	0,230	0,147	8	0,338	0,411	9	0,274	0,250	6	0,197	0,224
	D-/R-	17	0,134	0,105	9	0,204	0,199	12	0,182	0,071	10	0,169	0,159
L. T4 G/L	D+/R+	15	0,072	0,082	9	0,150	0,152	8	0,229	0,141	8	0,400	0,361
	D+/R-	9	0,055	0,072	9	0,050	0,058	9	0,115	0,107	5	0,319	0,212
	D-/R+	10	0,025	0,037	8	0,149	0,108	9	0,177	0,140	6	0,118	0,065
	D-/R-	17	0,106	0,074	9	0,087	0,097	12	0,187	0,121	10	0,208	0,132
L. T8 G/L	D+/R+	15	0,195	0,269	9	0,957	1,292	8	0,793	0,592	8	0,953	0,568
	D+/R-	9	0,074	0,095	9	0,122	0,138	9	0,160	0,146	5	0,350	0,262
	D-/R+	10	0,044	0,087	8	0,993	1,891	9	0,533	0,539	6	0,524	0,625
	D-/R-	17	0,097	0,090	9	0,107	0,076	12	0,336	0,245	10	0,336	0,209

**Tableau 17 : Moyenne et sous-populations lymphocytaires en fonction d'une infection à CMV**

CMV INFECTION		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	OUI	16	0,497	0,322	11	1,859	2,283	7	2,017	0,957	8	2,141	0,958
	NON	35	0,348	0,230	24	0,692	0,677	31	0,947	0,640	21	1,225	0,958
L.B G/L	OUI	16	0,007	0,010	11	0,089	0,164	7	0,206	0,332	8	0,391	0,360
	NON	35	0,003	0,005	24	0,110	0,218	31	0,184	0,200	21	0,302	0,342
L. NK G/L	OUI	16	0,210	0,167	11	0,282	0,386	7	0,391	0,327	8	0,321	0,415
	NON	35	0,132	0,102	24	0,243	0,273	31	0,198	0,140	21	0,169	0,166
L. T4 G/L	OUI	16	0,064	0,076	11	0,132	0,147	7	0,169	0,117	8	0,257	0,185
	NON	35	0,075	0,075	24	0,097	0,095	31	0,178	0,132	21	0,263	0,260
L. T8 G/L	OUI	16	0,155	0,188	11	1,248	1,884	7	1,055	0,657	8	0,988	0,572
	NON	35	0,092	0,160	24	0,204	0,243	31	0,298	0,235	21	0,380	0,347

**Tableau 18: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'âge du donneur**

Age Donneur		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	1 à 10 ans	2	0,330	0,051	2	2,120	1,597	3	1,594	1,254	2	1,646	0,154
	10 à 25 ans	12	0,397	0,216	7	0,601	0,417	6	1,671	0,784	8	1,729	1,354
	25 à 50 ans	34	0,409	0,301	23	1,189	1,702	26	1,062	0,741	17	1,444	0,951
	+ de 50 ans	3	0,257	0,102	3	0,419	0,385	3	0,346	0,065	2	0,596	0,364
L. B G/L	1 à 10 ans	2	0,004	0,001	2	0,667	0,481	3	0,399	0,319	2	0,241	0,057
	10 à 25 ans	12	0,005	0,007	7	0,131	0,188	6	0,386	0,305	8	0,512	0,394
	25 à 50 ans	34	0,005	0,008	23	0,058	0,097	26	0,138	0,164	17	0,276	0,331
	+ de 50 ans	3	0,001	0,001	3	0,015	0,027	3	0,015	0,020	2	0,108	0,090
L. NK G/L	1 à 10 ans	2	0,145	0,142	2	0,701	0,893	3	0,303	0,307	2	0,180	0,180
	10 à 25 ans	12	0,135	0,101	7	0,151	0,123	6	0,343	0,277	8	0,259	0,239
	25 à 50 ans	34	0,166	0,144	23	0,243	0,282	26	0,215	0,171	17	0,210	0,294
	+ de 50 ans	3	0,143	0,067	3	0,299	0,226	3	0,111	0,014	2	0,056	0,006
L. T4 G/L	1 à 10 ans	2	0,069	0,061	2	0,190	0,117	3	0,301	0,167	2	0,479	0,252
	10 à 25 ans	12	0,114	0,099	7	0,084	0,062	6	0,296	0,162	8	0,347	0,359
	25 à 50 ans	34	0,059	0,064	23	0,109	0,129	26	0,145	0,096	17	0,208	0,157
	+ de 50 ans	3	0,041	0,032	3	0,099	0,069	3	0,089	0,054	2	0,157	0,079
L. T8 G/L	1 à 10 ans	2	0,060	0,053	2	0,403	0,003	3	0,301	0,233	2	0,640	0,013
	10 à 25 ans	12	0,107	0,116	7	0,169	0,124	6	0,518	0,267	8	0,486	0,445
	25 à 50 ans	34	0,121	0,197	23	0,710	1,393	26	0,470	0,515	17	0,601	0,568
	+ de 50 ans	3	0,049	0,042	3	0,096	0,073	3	0,125	0,076	2	0,255	0,170

**Tableau 19 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'âge du receveur**

AGE RECEVEUR		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	<= 1 an	3	0,356	0,150	2	0,896	0,105	3	1,165	1,017	2	3,031	2,112
	1 à 10 ans	11	0,484	0,280	7	1,595	2,025	9	1,221	0,838	7	1,343	0,941
	10 à 25 ans	11	0,371	0,286	9	1,282	1,876	8	1,035	0,711	9	1,053	0,740
	25 à 50 ans	17	0,392	0,300	11	0,567	0,355	10	1,137	0,910	7	1,699	1,006
	plus de 50 ans	9	0,330	0,220	6	1,054	1,658	8	1,166	0,886	4	1,508	0,909
L.B G/L	<= 1 an	3	0,003	0,003	2	0,138	0,084	3	0,159	0,182	2	0,530	0,467
	1 à 10 ans	11	0,003	0,003	7	0,193	0,379	9	0,317	0,259	7	0,417	0,467
	10 à 25 ans	11	0,003	0,005	9	0,070	0,120	8	0,146	0,175	9	0,342	0,384
	25 à 50 ans	17	0,006	0,010	11	0,086	0,164	10	0,178	0,286	7	0,265	0,182
	plus de 50 ans	9	0,005	0,006	6	0,070	0,084	8	0,108	0,116	4	0,143	0,159
L. NK G/L	<= 1 an	3	0,116	0,128	2	0,171	0,184	3	0,326	0,298	2	0,470	0,231
	1 à 10 ans	11	0,177	0,066	7	0,524	0,582	9	0,197	0,180	7	0,077	0,059
	10 à 25 ans	11	0,115	0,165	9	0,172	0,113	8	0,174	0,044	9	0,129	0,089
	25 à 50 ans	17	0,142	0,085	11	0,144	0,101	10	0,290	0,291	7	0,423	0,419
	plus de 50 ans	9	0,222	0,194	6	0,299	0,211	8	0,229	0,137	4	0,129	0,109
L. T 4 G/L	<= 1 an	3	0,092	0,022	2	0,240	0,102	3	0,278	0,231	2	0,738	0,619
	1 à 10 ans	11	0,100	0,070	7	0,091	0,100	9	0,225	0,158	7	0,297	0,239
	10 à 25 ans	11	0,070	0,092	9	0,109	0,104	8	0,127	0,100	9	0,199	0,150
	25 à 50 ans	17	0,071	0,082	11	0,079	0,058	10	0,171	0,087	7	0,246	0,135
	plus de 50 ans	9	0,032	0,039	6	0,136	0,196	8	0,141	0,105	4	0,130	0,047
L. T 8 G/L	<= 1 an	3	0,100	0,012	2	0,240	0,025	3	0,286	0,211	2	1,049	0,565
	1 à 10 ans	11	0,147	0,198	7	0,626	1,243	9	0,326	0,205	7	0,370	0,348
	10 à 25 ans	11	0,111	0,125	9	0,883	1,797	8	0,505	0,613	9	0,317	0,224
	25 à 50 ans	17	0,133	0,225	11	0,226	0,280	10	0,392	0,316	7	0,611	0,489
	plus de 50 ans	9	0,031	0,034	6	0,555	1,166	8	0,608	0,665	4	1,017	0,785

**Tableau 20 : Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de la dose de CD34+ injectée au patient**

CD34 (10 <sup>6</sup> /kg)		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	1<X<=2	5	0,563	0,479	2	0,623	0,322	3	0,567	0,126	4	1,349	0,366
	2<X<=4	16	0,332	0,217	12	1,113	1,643	13	1,196	0,778	11	1,478	1,194
	4<X<=6	16	0,360	0,292	10	1,721	1,945	9	1,243	0,934	5	1,620	1,069
	> 6	14	0,445	0,185	11	0,476	0,245	13	1,157	0,862	9	1,457	1,131
L. B G/L	1<X<=2	5	0,001	0,002	2	0,011	0,009	3	0,044	0,016	4	0,316	0,197
	2<X<=4	16	0,003	0,005	12	0,055	0,085	13	0,215	0,263	11	0,336	0,351
	4<X<=6	16	0,003	0,006	10	0,233	0,321	9	0,278	0,244	5	0,632	0,511
	> 6	14	0,008	0,009	11	0,055	0,107	13	0,132	0,175	9	0,151	0,136
L. NK G/L	1<X<=2	5	0,132	0,058	2	0,185	0,117	3	0,160	0,100	4	0,120	0,048
	2<X<=4	16	0,123	0,125	12	0,203	0,154	13	0,250	0,206	11	0,253	0,230
	4<X<=6	16	0,162	0,105	10	0,470	0,477	9	0,233	0,163	5	0,155	0,132
	> 6	14	0,197	0,171	11	0,130	0,149	13	0,235	0,238	9	0,231	0,389
L. T4 G/L	1<X<=2	5	0,117	0,127	2	0,121	0,093	3	0,119	0,039	4	0,324	0,021
	2<X<=4	16	0,074	0,067	12	0,095	0,095	13	0,184	0,148	11	0,318	0,321
	4<X<=6	16	0,037	0,050	10	0,128	0,159	9	0,175	0,110	5	0,208	0,216
	> 6	14	0,091	0,077	11	0,101	0,096	13	0,184	0,139	9	0,195	0,183
L. T8 G/L	1<X<=2	5	0,280	0,378	2	0,296	0,329	3	0,201	0,083	4	0,531	0,306
	2<X<=4	16	0,107	0,104	12	0,725	1,577	13	0,462	0,473	11	0,463	0,394
	4<X<=6	16	0,083	0,177	10	0,780	1,274	9	0,415	0,531	5	0,382	0,407
	> 6	14	0,089	0,081	11	0,139	0,116	13	0,482	0,443	9	0,750	0,686

**Tableau 21: Moyenne et écart-type des sous populations lymphocytaires en fonction de l'utilisation du rituximab**

RITUXIMAB		J30			J90			J180			J360		
		Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D	Eff.	Moy.	S.D
LYMPHO G/L	OUI	9	0,574	0,366	5	2,830	2,787	5	0,757	0,833	5	0,974	1,150
	NON	42	0,356	0,231	30	0,763	0,902	33	1,202	0,804	24	1,583	0,995
L.B G/L	OUI	9	0,002	0,004	5	0,046	0,103	5	0,032	0,072	5	0,256	0,464
	NON	42	0,005	0,007	30	0,113	0,212	33	0,212	0,231	24	0,342	0,323
L. NK G/L	OUI	9	0,208	0,170	5	0,366	0,538	5	0,147	0,105	5	0,132	0,048
	NON	42	0,145	0,118	30	0,237	0,262	33	0,247	0,206	24	0,227	0,283
L. T4 G/L	OUI	9	0,098	0,091	5	0,177	0,113	5	0,084	0,066	5	0,199	0,219
	NON	42	0,066	0,071	30	0,096	0,111	33	0,191	0,130	24	0,275	0,245
L. T8 G/L	OUI	9	0,207	0,227	5	2,053	2,406	5	0,437	0,771	5	0,330	0,383
	NON	42	0,091	0,151	30	0,279	0,539	33	0,437	0,401	24	0,593	0,510



N° d'identification :

TITRE

**RECONSTITUTION DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LE PATIENT  
EN SUITE D'ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES.  
Etude rétrospective de 60 patients**

Thèse soutenue le 28/10/2009

Par Marc MULLER

RESUME

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapeutique cellulaire utilisée dans le traitement des hémopathies malignes et non malignes. Elle nécessite l'injection de cellules caractérisées par trois propriétés : multipotence, autorenouvellement et migration. De nombreux mécanismes de régulations permettent à une CSH de se différencier en lymphocytes et nous rappelons les principales étapes du développement lymphocytaire. Par ailleurs, nous avons observé rétrospectivement la reconstitution des sous-populations lymphocytaires T, B, NK chez 60 patients allogreffés de CSH au cours de la première année et avons évalué les facteurs pouvant influencer cette reconstitution. Certains facteurs influencent peu la reconstitution : le conditionnement, l'origine du greffon (familial ou don volontaire), ou la présence d'une incompatibilité HLA. Par contre, certains facteurs influencent beaucoup la reconstitution des lymphocytes B : la GvH, la greffe par CSP, l'emploi du rituximab après la greffe, altèrent la reconstitution lymphocytaire B de manière plus ou moins importante. Au contraire, l'emploi de sérum antilymphocytaire favoriserait cette reconstitution. L'origine et le type de greffon influence la reconstitution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'infection à CMV et les sérologies pré-greffe témoignent d'une meilleure reconstitution CD8<sup>+</sup> chez les patients ayant présenté une infection, risque d'autant plus élevé que le receveur est séropositif pour ce virus. L'âge du donneur et du receveur semble influencer la reconstitution des sous-populations lymphocytaires mais notre échantillon n'est pas assez représentatif. Enfin, la quantité de cellules CD34<sup>+</sup> injectée au patient n'influence pas la reconstitution des sous populations lymphocytaires, à l'exception des greffons de moins de 2.10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup>/kg. Il apparaît donc que la population cellulaire la plus sensible à l'ensemble de ces paramètres est la population des lymphocytes B.

**MOTS CLES :** Lymphopoïèse, greffe, cellules souches hématopoïétiques, sous-populations lymphocytaires

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr Ali DALLOUL	Unité Thérapie Cellulaire et Tissulaire  CHU Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes :

5 - Biologie

6 – Pratique professionnelle