

Modulation de la réactivité allogénique après la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Pierre Tiberghien
Jean-Yves Cahn
Patrick Hervé

Un greffon hématopoïétique allogénique comprend des cellules souches capables de reconstituer, de façon durable, une hématopoïèse complète. Il comprend aussi des cellules matures, immunocompétentes, susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger. Cette réactivité allogénique est responsable, d'une part, d'une complication de la greffe, la GvH (*graft versus host*) et, d'autre part, d'effets bénéfiques sur la prise de greffon et surtout d'une activité antitumorale importante, la GvL (*graft versus leukemia*). Les lymphocytes T matures présents dans le greffon, la compatibilité tissulaire et le contexte cytokinique lors de la greffe jouent un rôle déterminant dans cette alloréactivité que l'on devrait pouvoir développer comme outil d'immunothérapie. En permettant un contrôle efficace de la GvH et l'intégration après la greffe de différentes approches d'immunomodulation spécifique, la déplétion des lymphocytes T du greffon constitue le point de départ d'une greffe devenue polymorphe et surtout adaptée au type d'affection traitée, au degré de compatibilité entre le donneur et le receveur, à la réponse antitumorale souhaitée et à l'alloréactivité constatée.

ADRESSES

P. Tiberghien : *docteur en médecine, docteur ès sciences, maître de conférences des universités, praticien hospitalier*. Laboratoire de thérapeutique immunomoléculaire, établissement de transfusion sanguine de Franche-Comté, 1, boulevard Fleming, 25000 Besançon, France. J.Y. Cahn : *docteur en médecine, professeur des universités, praticien hospitalier*. Service d'hématologie, CHU Besançon, 25000 Besançon, France. P. Hervé : *docteur en médecine, professeur des universités, praticien hospitalier*. Établissement de transfusion sanguine de Franche-Comté, 1, boulevard Fleming, 25000 Besançon, France.

TIRÉS À PART

P. Tiberghien.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogénique représente une alternative thérapeutique majeure dans le traitement des hémopathies malignes, des déficits immunitaires sévères et de certaines maladies héréditaires du globe rouge. Les tumeurs solides, les maladies auto-immunes sévères ou encore la transplantation d'organes sont d'autres situations dans les-

quelles le potentiel de la greffe de CSH est actuellement exploré. Jusqu'à récemment, la source des CSH était exclusivement médullaire. La possibilité de mobiliser des CSH hors des cavités médullaires conduit maintenant à utiliser, dans certaines circonstances, de telles cellules issues du sang périphérique dans un contexte allogénique [1]. Par ailleurs, le sang présent dans le cordon ombilical, particulièrement riche en pro-

RÉFÉRENCES

1. Goldman J. Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood* 1995; 85: 1413-5.
2. Wagner JE, Kernan NA, Szeinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346: 214-20.
3. Sullivan KM. Graft-versus-host disease. In : Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, eds. *Bone marrow transplantation*. Oxford: Blackwell Scientific, 1994: 339-62.
4. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FR, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-62.
5. Antin JH. Graft-versus-leukemia: non longer an epiphenomenon. *Blood* 1993; 82: 2273-7.
6. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-30.
7. Kourilsky P, Calverie JM. Le modèle du soi peptidique. *Med Sci* 1988; 4: 177-83.
8. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 75-81.
9. den Haan JMM, Scherman NE, Blockland E, Huczjo E, Koning F, Wouter-Drijfhout J, Skipper J, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Goulmy E. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995; 268: 1476-80.
10. Wang W, Meadows LR, den Haan JMM, Sherman NE, Chen Y, Blockland E, Shabanowitz J, Agulnik AI, Hendrickson RC, Bishop CE, Hunt DF, Goulmy E, Engelhard VH. A male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 1995; 269: 1588-90.
11. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blockland E, Falkenburg FJH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, Van Houwelingen HC, Van Rood JJ. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334: 281-5.
12. Behar E, Nelson Ph D, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zandher JL, Grumet FC. Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 286-91.
13. Parfrey N, Ste-Croix H, Prud'homme GJ. Evidence that nonlymphoid tissue injury in acute graft-versus-host disease is limited to epithelial cells aberrantly expressing MHC antigens. *Transplantation* 1989; 48: 655-60.

généiteurs hématopoïétiques, est capable d'assurer une reconstitution hématopoïétique allogénique satisfaisante et l'utilisation d'une telle source de CSH est de plus en plus fréquemment envisagée [2]. Après un traitement myéloablatif et immunosuppresseur (comportant une chimiothérapie intensive accompagnée ou non d'une irradiation corporelle totale), le greffon hématopoïétique est administré par voie intraveineuse. Le plus souvent, les donneurs potentiels de CSH sont recherchés parmi la fratrie du patient, de façon à permettre une identité génotypique au niveau des antigènes majeurs d'histocompatibilité. Seule l'utilisation de CSH prélevées chez un vrai jumeau permet une identité totale incluant les antigènes mineurs d'histocompatibilité. Afin d'augmenter le nombre de donneurs potentiels, des registres de donneurs volontaires ont été constitués (environ trois millions de donneurs sont disponibles dans le monde en 1996) permettant ainsi d'envisager dans 30 % à 40 % des cas l'utilisation d'un donneur identique sur un plan phénotypique pour les antigènes majeurs d'histocompatibilité. L'utilisation d'un donneur intra-familial partiellement identique reste limitée par l'importante alloréactivité associée à ce type de greffe. Enfin, malgré des problèmes immunologiques et infectieux non encore maîtrisés, la greffe de CSH xénogénique demeure une potentialité qui ne peut plus être ignorée.

Un greffon de cellules souches hématopoïétiques: un organe immunocompétent

Un greffon hématopoïétique, qu'il soit d'origine médullaire, sanguine ou placentaire, comprend, d'une part, des cellules souches capables de reconstituer de façon durable une hématopoïèse complète et, d'autre part, des cellules immunocompétentes, telles que les lymphocytes T, susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger. Ces lymphocytes T mûrs sont responsables, après la greffe de CSH allogénique, d'une complication importante dont la morbidité et la mortalité demeurent élevées: la

maladie du greffon contre l'hôte (GvH, *graft versus host*) [3]. A l'inverse, ces lymphocytes T jouent un rôle important dans la prévention du rejet de la greffe (HvG, *host versus graft*) et contribuent de façon significative à l'effet antitumoral associé à la greffe: l'effet greffon contre la leucémie (GvL, *graft versus leukemia*) [4]. Cet effet GvL constitue la modalité d'immunothérapie des cancers la plus puissante disponible aujourd'hui [5] et justifie à lui seul l'utilisation de la greffe de CSH allogénique pour le traitement de certaines hémopathies malignes (figure 1).

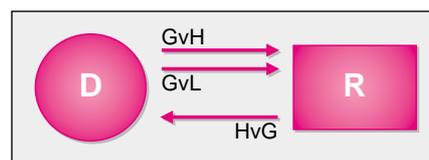


Figure 1. **Alloréactivité après greffe de cellules souches hématopoïétiques.** Les cellules du donneur (D) sont l'objet de la réaction de rejet HvG (host versus graft) par le système immunologique du receveur (R). Les lymphocytes du donneur réagissent également contre les cellules du receveur (GvH: graft versus host), notamment contre les cellules leucémiques (GvL: graft versus leukemia).

La déplétion *ex vivo* des lymphocytes T présents dans le greffon allogénique et/ou une immunosuppression après la greffe (administration de ciclosporine associée au méthotrexate et/ou aux corticoïdes, et plus récemment de FK506) sont actuellement les deux méthodes utilisées pour essayer de prévenir l'effet délétère de la réactivité allogénique après la greffe de CSH. Mais, à côté de son efficacité pour prévenir la GvH, la déplétion *ex vivo* des lymphocytes T du greffon est associée à une augmentation du risque de rejet de la greffe et de rechute leucémique [6]. L'immunosuppression seule, après transplantation d'un greffon non manipulé, est nettement moins efficace en matière de prévention de la GvH. En revanche, cette immunosuppression n'interfère pas avec la prise d'un greffon allogénique et permet de conserver un effet GvL qui peut être observé

même en l'absence de GvH. L'hôte, malgré un conditionnement immunosuppresseur optimal, peut rejeter un greffon médullaire dans certaines circonstances : nombre insuffisant de cellules souches transplantées, disparité importante entre le donneur et le receveur ou nombre limité de lymphocytes T présents dans le greffon. Ce conflit immunologique entre le donneur et le receveur, susceptible d'entraîner à la fois des complications sévères parfois mortelles et des bénéfices thérapeutiques majeurs est l'un des aspects les plus critiques de la greffe de CSH.

L'alloréactivité après la greffe de cellules souches hématopoïétiques : la biologie

Les bases moléculaires de cette allo-réactivité à la fois délétère (GvH, HvG) et bénéfique (GvL) restent aujourd'hui imparfaitement comprises (Tableau I). Il faut distinguer, d'une part, les greffes HLA identiques sur un plan génotypique (greffe HLA identique intrafamiliale) dans lesquelles les éléments d'incompatibilité tissulaire sont au niveau d'antigènes mineurs d'histocompatibilité et, d'autre part, les greffes HLA identiques sur un plan phénotypique (donneur en dehors de la famille) ou HLA non identique dans lesquelles les incompatibilités seront dominées par des différences au niveau d'antigènes majeurs d'histocompatibilité.

Selon le modèle du « soi peptidique » décrit par Claverie et Kourilsky [7], le polymorphisme des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (et leurs capacités d'allostimulation) sont déterminés non pas par la molécule HLA *per se* mais par la nature du peptide porté par la molécule HLA qui résulte d'un apprêtement (*processing*) intracellulaire. En effet, la plupart des résidus polymorphes au niveau de la molécule HLA se trouvent dans la poche peptidique, et sont donc inaccessibles au récepteur T. En revanche, ces mêmes résidus polymorphes déterminent la nature du peptide pouvant se positionner dans la poche. Quatre types d'alloréactivité mutuellement non exclusive sont décrits : (1) contre un peptide provenant d'une protéine du soi et sélectionné par le CMH allogénique (allo-CMH) ; (2) contre un peptide de l'allo-CMH présenté par l'allo-CMH (par exemple : peptide dérivé d'un allo-DR présenté par un allo-DQ) ; (3) contre des résidus polymorphes entre CMH autologue et allogénique ; (4) contre des allopeptides présentés par un auto-CMH (il s'agit dans ce dernier cas d'un mécanisme indirect).

Jusqu'à récemment, les antigènes mineurs d'histocompatibilité étaient définis principalement par exclusion : antigènes distincts des antigènes majeurs mais capables de conduire à un rejet ou à une GvH aiguë. En fait, les antigènes mineurs sont des peptides immunogènes présentés (et donc restreints) par les molécules HLA et dérivés de protéines du soi dotées d'une variabilité allélique [8].

Ceux-ci ségrègent de façon mendélienne et indépendante du HLA. Des analyses immunogénétiques de clones T cytotoxiques présents chez des patients présentant une GvH ou un rejet après une greffe HLA-identique intrafamiliale, ont permis de mettre en évidence plusieurs antigènes mineurs d'histocompatibilité restreints par les molécules du CMH de classe I ou de classe II. L'équipe d'Els Goulmy (Leyden, Pays-Bas) a identifié un antigène mineur d'histocompatibilité dans le contexte d'une GvH : il s'agit du peptide HA-2 (restreint par la molécule HLA-A2.1) qui provient d'un membre de la famille de la myosine classe I [9]. Parallèlement, un antigène H-Y, restreint par HLA-B7 a été identifié comme un résidu peptidique d'une protéine SMCY dont le gène se trouve sur le chromosome Y [10]. Certains de ces antigènes (tels que HA-1, HA-2 et HA-5) sont exprimés uniquement sur les cellules hématopoïétiques. Le rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité dans la survenue d'une GvH a été récemment souligné par la démonstration d'une corrélation entre une incompatibilité HA-1 chez des couples donneur-receveur HLA-A2 et la survenue d'une GvH [11]. Parallèlement, la mise en évidence qu'une incompatibilité génotypique pour la molécule d'adhérence CD31 est également associée à un risque accru de GvH [12] suggère que beaucoup de molécules dotées de polymorphisme seraient capables d'agir comme antigènes mineurs d'histocompatibilité.

La GvH

En 1955, Barnes *et al.* rapportent une maladie dite « secondaire » comportant une cachexie, une diarrhée, un érythème et une splénomégalie. Cette maladie, d'évolution mortelle, survient chez des souris irradiées recevant des splénocytes irradiés. Au cours d'expériences pionnières, Billingham *et al.* ont décrit trois prérequis pour le développement de cette réaction du greffon contre l'hôte : (1) la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon ; (2) l'incapacité pour l'hôte de rejeter les cellules administrées ; et (3) un certain degré d'histoincompatibilité entre le donneur et le receveur.

Cette GvH reste une complication sévère de la greffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'homme. Elle est responsable d'une mortalité de 10 % à 50 % et d'une morbidité considérable pour lesquelles les principaux facteurs de risques sont le degré de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur, l'âge du receveur (et de façon moindre celui du donneur), et le contexte viral lors de la greffe [3]. La GvH aiguë survient pendant les 100 premiers jours après la greffe avec un tableau clinique associant une atteinte digestive, cutanée et hépatique doublée d'une importante immunosuppression. L'atteinte médullaire, observée lors des GvH transfusionnelles n'est pas observée après la greffe en raison de la compatibilité tissulaire entre les cellules immunes et les cellules hématopoïétiques. La spécificité tissulaire de la GvH pourrait être liée à une expression inappropriée de molécules du CMH (surtout de classe II) [13], une antigénicité croisée entre épitopes microbiens et épitopes viraux [14]. La GvH chronique, dont la survenue est étroitement liée à une GvH aiguë préalable, est une maladie de nature auto-immune qui peut être associée à une morbidité considérable.

La démonstration que la déplétion des lymphocytes T présents dans le greffon prévient la survenue d'une GvH a permis de mettre en évidence le rôle central de cette population cellulaire dans le déclenchement de la GvH. Deux approches successives, pour une large part complémentaires,

RÉFÉRENCES

14. Grundy JE, Shanley JD, Shearer GM. Augmentation of graft-versus-host reaction by cytomegalovirus infection resulting in interstitial pneumonitis. *Transplantation* 1985; 39: 548-53.
 15. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 667-74.
 16. Antin JH, Ferrara JLM. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; 80: 2964-8.
 17. Fowler DH, Kurosawa K, Husebeck A, Cohen PA, Gress RE. Cells of Th2 cytokine phenotype prevent LPS-induced lethality during murine graft-versus-host reaction. *J Immunol* 1994; 152: 1004-13.
 18. Ushiyama C, Hirano T, Miyajima H, Okumura K, Ovary Z, Hashimoto H. Anti-IL-4 antibody prevents graft-versus-host disease in mice after bone marrow transplantation. *J Immunol* 1995; 154: 2687-96.
 19. Blaise D, Olive D, Michallet M, Marit G, Leblond V, Maraninchi D. Impairment of leukaemia-free survival by addition of interleukin-2 receptor antibody to standard graft-versus-host prophylaxis. *Lancet* 1995; 345: 1144-6.
 20. Kolb H, Mittermuller J, Clemm C, Walther C, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76: 2462-5.
 21. Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You SG, Cheever MA. T-cell immunity to the joining region of p210 BCR-ABL protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1468-72.
 22. Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, Sidney J, McGraw K, Scheinberg DA, Sette A. Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class II molecules. *Blood* 1995; 85: 2680-4.
 23. Cullis JO, Barrett AJ, Goldman JM, Lechler RI. Binding of BCR/ABL junctional peptides to MHC class II molecules: studies in antigen processing defective cell lines. *Leukemia* 1994; 8: 165-70.
 24. Oettel KR, Wesley OH, Albertini M, Hank JA, Iliopolis O, Sosman JA, Voelkerding K, Wu SQ, Clark SS, Sondel PM. Allogeneic T-cell clones able to selectively destroy Philadelphia chromosome (Ph⁺) bearing human leukemia lines can also recognise Ph⁻ negative cells from the same patient. *Blood* 1994; 83: 3390-402.
 25. Barrett AJ, Guimaraes A, Cullis JO, Goldman JM. Immunological characterisation of the tumor-specific BCR/ABL junction of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. *Stem Cells* 1993; suppl 3: 104-8.
 26. Korngold R, Leighton C, Mauser T. Graft-vs-myeloid leukemia responses following syngeneic and allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994; 58: 278-87.
- ont été mises en avant pour expliquer la physiopathologie de la GvH. La première approche, plutôt cellulaire, donne la primauté au lymphocyte T alloréactif et distingue une phase afférente avec la présentation de l'antigène, l'activation et l'expansion clonale lymphocytaire T, et une phase efférente dans laquelle interviennent des effecteurs cytotoxiques cellulaires (lymphocytes T cytotoxiques, cellules *natural killer*, macrophages) et cytokiniques [15]. La deuxième approche, plus récente, met l'accent sur le rôle important des cytokines inflammatoires de type TH1 (« l'orage cytokinique ») dans la GvH aiguë à la fois dans la phase afférente et dans la phase efférente [16]. Le rôle de ces cytokines TH1 et, *a contrario*, l'effet éventuellement protecteur de cytokines de type TH2, a été récemment souligné dans un modèle expérimental de GvH aiguë [17]. L'importance du « climat cytokinique » lors de la greffe dans l'éventuelle survenue d'une GvH ultérieure et de son intensité expliquent, d'une part, la difficulté, voire l'impossibilité, de disposer avant la greffe d'éléments prédictifs fiables sur le risque et la sévérité d'une GvH ultérieure et, d'autre part, les liens constatés entre la toxicité du conditionnement, le contexte viral et la GvH.
- La physiopathologie de la GvH chronique reste mal comprise et a longtemps été perçue comme une simple extension dans le temps de l'alloréactivité de la GvH aiguë. En fait, même si une GvH aiguë préalable est un incontestable facteur de risque, la GvH chronique est associée à des anomalies de la reconstitution immunologique avec la production de clones autoréactifs. Récemment, un rôle délétère de l'IL-4, cytokine de type TH2, a été décrit dans un modèle expérimental de GvH chronique [18].

La GvL

La notion que l'alloréactivité puisse relayer un effet antileucémique revient à Barnes *et al.* avec des études *princeps* montrant qu'une greffe de moelle syngénique chez des souris leucémiques était suivie du décès par récurrence leucémique. Cela n'était pas le cas chez plusieurs receveurs d'un greffon allogénique mais, ces der-

niers décédaient ultérieurement de GvH. En 1965, Mathé *et al.* furent les premiers à décrire le potentiel thérapeutique de cette forme d'immunothérapie adoptive des leucémies. L'importance de cet effet GvL est maintenant bien établie chez l'homme avec la démonstration que le taux de rechute leucémique est moindre chez les patients présentant une GvH aiguë et/ou chronique. Cet effet GvL est observé même en l'absence de GvH clinique (mais de façon moindre) comme l'indique le taux de rechute plus élevé après une greffe allogénique comportant une déplétion des lymphocytes T, qu'après une greffe allogénique sans déplétion des lymphocytes T en l'absence de GvH [4]. Ainsi, un effet GvL nécessite une disparité allogénique, des lymphocytes T mûrs dans le greffon et sera potentialisé par la survenue d'une GvH. Cet effet GvL peut être particulièrement précoce comme le suggère la démonstration récente que l'administration d'un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-2 (p55) pendant les 28 premiers jours après la greffe sans déplétion des lymphocytes T réduisait de façon significative le taux de survie sans rechute sans modifier l'incidence de survenue de GvH aiguë, celle-ci survenant toutefois de façon plus tardive [19]. L'observation par Kolb *et al.* que des patients, porteurs de leucémie myéloïde chronique et ayant rechuté après greffe de moelle osseuse allogénique, pouvaient être remis en rémission complète par l'administration de lymphocytes du donneur [20] constitue la meilleure preuve directe de cet effet GvL. D'autres études ont rapidement confirmé cette observation avec l'obtention d'environ 70 % de rémission complète chez les patients porteurs de leucémie myéloïde en phase chronique [5]. Des rémissions ont été également observées dans les leucémies aiguës myéloïdes, polyglobulies et myélomes. La rechute après greffe de CSH allogénique provient le plus souvent des cellules de l'hôte alors que l'hématopoïèse résiduelle et l'immunité restent le plus souvent dérivées du donneur. Ainsi, les lymphocytes du donneur ne sont pas rejetés. En revanche, une GvH, parfois sévère, est observée dans 80 % des cas. Pour les patients en rechute dont l'hématopoïèse physiologique rési-

duelle est réprimée et/ou d'origine autologue (situation rencontrée lors d'une GvH post-transfusionnelle), une cytopénie, voire une aplasie médullaire peut être également observée nécessitant alors, si possible, une deuxième administration de cellules souches hématopoïétiques du donneur. Cet effet GvL, avec une déplétion leucémique pouvant ne garder qu'une cellule sur 10^6 [5], permet ainsi de récuser la notion qu'une immunothérapie anti-tumorale ne peut être active que sur une maladie « résiduelle ».

Les antigènes cibles et les mécanismes effecteurs de l'effet GvL ne sont que partiellement définis. Dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique, une cible évidente pourrait être la protéine de fusion Bcr/Abl. L'immunisation de souris avec des peptides synthétiques correspondant à la jonction Bcr/Abl permet d'obtenir des lymphocytes $CD4^+$ spécifiques pour le peptide [21]. *In vitro* chez l'homme, des peptides jonctionnels sont capables de se lier spécifiquement à des molécules HLA [22]. Toutefois, certaines molécules HLA, très représentées telles que A2 ou B35, ne semblent pas posséder cette propriété [23]. Des lignées $CD4^+$ dont la spécificité est dirigée contre des antigènes peptidiques Bcr/Abl ne sont pas capables de reconnaître des cellules de leucémie myéloïde chronique. En outre, l'utilisation de lymphocytes transformés par le virus d'Epstein-Barr (EBV) Ph^+ et Ph^- provenant d'un même patient n'a pas permis de mettre en évidence une réponse T spécifiquement dirigée contre Bcr/Abl [24]. Enfin, aucun accroissement de la fréquence de lymphocytes T reconnaissant Bcr/Abl n'est observé après greffe de CSH dans le cas de leucémie myéloïde chronique [25].

Il est important de noter que les réponses GvL observées sont associées à une élimination des cellules hématopoïétiques résiduelles normales de l'hôte, suggérant ainsi que des structures antigéniques polymorphes restreintes au tissu hématopoïétique (telles que HA-1 et HA-2) pourraient être en cause. Dans les modèles animaux des effecteurs GvL $CD4^+$ et $CD8^+$ ont été décrits [26]. Les cellules $CD8^+$ semblent être les effecteurs principaux de la GvL dans

les modèles de leucémie aiguë [27]. Chez l'homme, des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ antileucémiques ont été observées. Plusieurs études, chez des patients allogreffés en raison d'une leucémie myéloïde chronique, ont permis de mettre en évidence des clones $CD4^+$ capables soit d'inhiber les progéniteurs leucémiques, soit d'être directement lytiques [28]. Des cytokines de type TH1, telles que le $TNF-\alpha$ et l' $IFN-\gamma$, ont été récemment impliquées dans ces mécanismes effecteurs [28]. La GvL est-elle séparable de l'effet GvH? Il est probable que la réponse dépende principalement de l'antigène en cause. Si l'antigène impliqué dans l'effet GvL est spécifique de la cellule tumorale ou est un antigène mineur d'histocompatibilité dont l'expression est restreinte au tissu hématopoïétique, GvL et GvH sont potentiellement séparables. En revanche, si l'antigène reconnu lors de l'effet GvH est un antigène mineur (ou majeur) d'expression ubiquitaire, l'effet GvL sera proportionnel à l'intensité de la GvH. Toutefois, un défaut d'expression de co-sinaux de stimulation par la cellule tumorale pourrait conduire à une GvH sans GvL. Chez un patient, il est probable que l'effet GvL résulte de la reconnaissance à des degrés divers de ces trois types d'antigènes et de la qualité de ces interactions immunologiques.

La HvG

Outre la réduction de l'effet GvL, la déplétion des lymphocytes T est également associée à un risque accru de rejet de la greffe pouvant se traduire, soit par l'absence de prise initiale, soit par l'apparition d'une pancytopenie secondaire. La fréquence de cette complication après greffe de moelle osseuse HLA-identique avec déplétion des lymphocytes T est de 10 % [6] avec une augmentation lors de greffe de moelle osseuse non-HLA-identique.

Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer cette fréquence accrue de rejet: (1) déficit qualitatif ou quantitatif en CSH après les manipulations du greffon *ex vivo*; (2) rôle éradicateur de ces mêmes lymphocytes T sur l'hématopoïèse résiduelle de l'hôte; (3) production par les lymphocytes T présents dans

le greffon de facteurs de croissance hématopoïétique. La plupart des méthodes de déplétion des lymphocytes T conduisent à une perte substantielle en CSH. Par ailleurs, ce risque de rejet est inversement corrélié à l'intensité du conditionnement à la greffe [6]. Cela conforte l'hypothèse que la survenue d'un rejet peut être en rapport avec la persistance, après la greffe comportant une déplétion des lymphocytes T, de cellules immunocompétentes résiduelles de l'hôte. Des lymphocytes T de l'hôte possédant une activité antidonneur ont été mis en évidence lors de rejet [29]. Dans le même sens, une immunosuppression additionnelle après greffe de moelle osseuse avec déplétion des lymphocytes T réduit l'incidence du rejet.

L'alloréactivité après la greffe de cellules souches hématopoïétiques: études cliniques

En 1987, Maraninchi *et al.* rapportaient les résultats d'une étude contrôlée avec échantillonnage aléatoire (*randomisée*) comparant une greffe de moelle osseuse allogénique avec et sans déplétion des lymphocytes T pour le traitement de leucémies [30]. La déplétion des lymphocytes T du greffon médullaire permettait de réduire de façon significative à la fois la GvH aiguë (2 % contre 17 %) et chronique (4 % contre 26 %). Toutefois, ces bons résultats étaient contrebalancés par l'apparition de rejets de la greffe (25 % contre 0 %) et par une augmentation des rechutes leucémiques (29 % contre 8 %), avec pour conséquence un taux de survie similaire dans les deux groupes (49 % contre 62 %) (*Tableau I*).

Ce résultat, ainsi que d'autres similaires provenant du Registre international de greffe de moelle osseuse allogénique, conduisit les équipes fortement impliquées dans ce mode de prévention à remettre en cause la déplétion des lymphocytes T. Parallèlement, la greffe de moelle osseuse sans déplétion de lymphocytes T fut également encouragée par les résultats publiés en 1986 par Storb *et al.*, suggérant que l'association de cyclosporine et de méthotrexate pourrait

RÉFÉRENCES

27. Van der Harst D, Goulmy E, Falkenburg JHF, Hooji-Winkelaar YMC, Van Luxemburg-Heijs SAP, Goselink HM, Brand A. Recognition of minor histocompatibility antigens on lymphocytic and myeloid leukemic cells by cytotoxic T-cell clones. *Blood* 1994; 83: 1060-6.

28. Jiang YZ, Barrett AJ. Cellular and cytokine-mediated effects of CD4⁺ lymphocyte lines generated *in vitro* against chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1995; 23: 1167-72.

29. Sondel PM, Hank JA, Trigg ME, Kohler PC, Finlay JL, Blank J, Meisner L, Borchering W, Hong R, Steeves R, Billing R, Flynn B, Bozdech MJ. Transplantation of HLA-haploidentical T-depleted marrow for leukemia: autologous marrow recovery with specific immune sensitization to donor antigens. *Exp Hematol* 1986; 14: 278-86.

30. Maraninchi D, Blaise D, Rio B, Leblond Y, Dreyfus F, Gluckman E, Guyotat D, Pico JL, Michallet M, Ifrah N. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone marrow transplantation for standard risk leukemias. *Lancet* 1987; 2: 175-8.

31. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Appelbaum F, Anasetti C, Beatty P, Bensinger W, Berenson R, Buckner CD, Clift R, Doney K, Longston G, Hansen J, Hill R, Loughran T, Martin JP, Singer J, Sanders J, Stewart P, Sullivan K, Witherspoon R, Thomas ED. Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up a controlled trial. *Blood* 1989; 73: 1725-34.

32. Weaver CH, Clift RA, Deeg HJ, Storb R, Appelbaum FR, Bensinger W, Doney K, Hansen JA, Martin PO, Sanders J, Sullivan KM, Thomas ED, Singer J, Witherspoon R, Buckner CD. Effect of graft-versus-host prophylaxis on relapse in patients transplanted for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 885-93.

33. Blazar BR, Taylor PA, Linsley PS, Vallera DA. *In vivo* blockade of CD28/CTLA-4: B7/BB1 interaction with CTLA-4Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex (MHC) in mice. *Blood* 1994; 83: 3815-25.

34. Hervé P, Racadot E, Wendling D, Rumbach L, Tiberghien P, Cahn JY, Flesch M, Wijdenes J. Use of monoclonal antibodies *in vivo* as a strategy for alloimmune or autoimmune reactivity. Besançon's experience. *Immunol Rev* 1992; 129: 31-55.

35. Reisner Y, Martelli MF. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. *Immunol Today* 1995; 16: 437-40.

Tableau I				
PHÉNOMÈNES D'ALLORÉACTIVITÉ APRÈS LA GREFFE				
	GvH	GvL	HvG	Immuno-incompétence Complications virales (Lymphomes induits par EBV)
Incompatibilité HLA	↑↑	↑*	↑↑	↑↑↑
Intensification du conditionnement	↑	↑**	↓	↓ ou → (selon la nature l'intensification)
Déplétion T du greffon	↓↓	↓↓	↑	↑↑
Immunosuppression après greffe (ciclosporine...)	↓	↓	↓	↑

* L'importance de la relation entre l'effet GvL et l'incompatibilité HLA n'est pas encore établie.

** Il s'agit d'un effet indirect (↑ GvH; ↓ HvG).

décroître significativement l'incidence et la sévérité de la GvH aiguë par comparaison à une prophylaxie par ciclosporine seule avec une amélioration de la survie précoce. Toutefois, une mise à jour en 1990 de cette étude randomisée a montré que si l'association ciclosporine/méthotrexate restait effectivement associée à une meilleure survie chez les patients porteurs de leucémie myéloïde chronique (73 % contre 54 %), ce n'était plus le cas pour les patients présentant une leucémie aiguë myéloblastique (41 % contre 41 %) chez lesquels le bénéfice sur la survie précoce était annulé par une augmentation du taux de rechute (29 % contre 16 %) [31]. Cette tendance s'est confirmée par la suite et, récemment, chez des patients ayant reçu une prophylaxie par ciclosporine/méthotrexate, l'équipe de Seattle a rapporté des taux de rechute allant jusqu'à 44 % dans les leucémies aiguës myéloblastiques en première rémission complète [32].

Ces résultats suggèrent donc que toute « amélioration » dans l'immunosuppression après la transplantation pourrait avoir pour conséquence un taux de rechute plus important. De façon concordante, Bacigalupo *et al.* en 1991 ont rapporté, dans une étude randomisée comparant de fortes doses (5 mg/kg) à de faibles doses (1 mg/kg) de ciclosporine, que le bénéfice d'une meilleure prophylaxie de la GvH dans le groupe rece-

vant une forte dose de ciclosporine était annulé par l'augmentation du taux de rechute et la toxicité du traitement.

Il est probable que cette corrélation dépendante de la dose entre la prévention efficace de la GvH et l'augmentation des rechutes constatée avec la ciclosporine sera retrouvée également avec les nouveaux immunosuppresseurs tels que le FK506, la rapamycine ou la mycophénolate mofetil. En effet, ces nouveaux médicaments ne devraient pas séparer plus efficacement GvH et GvL que la ciclosporine. Dans le même ordre d'idée, il a été récemment montré que le blocage de l'interaction CD28/CTLA-4: B7 avec CTLA-4Ig permettait dans un modèle murin de réduire la sévérité de la GvH [33] et les effets d'un tel blocage du « deuxième signal » sur la GvL devront faire l'objet d'une évaluation attentive.

Une solution logique face à cette augmentation du taux de rechute pourrait être de renforcer les conditionnements préparant à la greffe. En l'absence de déplétion des lymphocytes T, cette stratégie entraîne malheureusement un accroissement de l'incidence de la GvH et de la toxicité. Dans une étude randomisée comparant une irradiation corporelle totale de 13,5 Gy et de 12 Gy avant greffe, pour leucémie aiguë, l'équipe de Seattle rapporte effectivement un taux de rechute plus bas

dans le groupe à 13,5 Gy (12 % contre 35 %) mais au prix d'une augmentation de l'incidence de GvH (48 % contre 21 %) avec pour résultat une survie sans rechute similaire dans les deux groupes. Une exacerbation de l'«orage cytokinique» est probablement responsable de cette augmentation de l'incidence de GvH et de toxicité.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que, de façon similaire à la déplétion des lymphocytes T, une meilleure prophylaxie de la GvH aiguë par l'accroissement de l'immunosuppression après la greffe, pourrait être associée à un taux de rechute plus important. Il existe un équilibre «délicat» entre la prophylaxie de la GvH, l'intensité du conditionnement, l'incidence de la GvH et le taux de rechute. En revanche, à la différence de la déplétion des lymphocytes T, ces différentes modalités d'immunosuppression après la greffe ne permettent pas de prévenir totalement la survenue de GvH sévère.

Comment moduler au mieux le potentiel alloréactif après la greffe de cellules souches hématopoïétiques ?

La nécessité d'une prophylaxie satisfaisante de la GvH aiguë est rendue d'autant plus primordiale que le traitement de la GvH aiguë ou chronique sévère reste extrêmement difficile. Peu de progrès ont été réalisés au cours de la dernière décennie malgré de multiples approches novatrices utilisant notamment des anticorps monoclonaux [34]. La mortalité de la GvH aiguë de grade IV reste proche de 100 % et de 75 % dans la GvH chronique sévère. Actuellement, un pourcentage non négligeable de patients recevant un greffon sans déplétion des lymphocytes T (20 % après greffe HLA identique intrafamiliale et plus de 50 % en cas de greffe HLA incompatible) vont décéder de complications directement induites par la procédure de la greffe.

Aujourd'hui, l'objectif majeur en matière de greffe de CSH est donc bien de conserver une prise satisfaisante du greffon, un bon contrôle de la maladie leucémique tout en prévenant efficacement la maladie du greffon contre l'hôte. Face à ce constat, il

est impératif d'explorer activement de nouvelles options thérapeutiques, et ce d'autant plus que l'on souhaite élargir le *pool* de donneurs potentiels afin de permettre un accès plus important à la greffe. La déplétion des lymphocytes T du greffon reste la seule technique capable de prévenir de façon efficace et reproductible les complications iatrogéniques que constituent la GvH aiguë et chronique; cette manipulation *ex vivo* du greffon nous paraît un excellent point de départ pour explorer de quelle façon pourrait être efficacement modulée l'alloréactivité après la greffe de CSH.

Intensification des conditionnements

Les études du registre international ont montré l'importance de paramètres tels que l'intensité de la dose et le fractionnement de l'irradiation corporelle totale sur le rejet et la rechute après greffe de moelle osseuse avec déplétion des lymphocytes T [6]. L'introduction de médicaments, d'une part myéloablatifs tels que le thiothépa et, d'autre part, lymphotoxiques, tels que le sérum antilymphocytaire a été associée à une réduction de l'incidence de rejet [35]. En combinant un conditionnement alourdi avant la greffe et un traitement par sérum antilymphocytaire et corticoïdes après la greffe, l'équipe du *Sloan Kettering* (New York, USA) observe une incidence négligeable de rejet ou d'absence de prise de la greffe comportant une déplétion des lymphocytes T. Cette intensification du conditionnement a toutefois pour inconvénient d'accroître de façon significative l'immunosuppression après la greffe avec une augmentation des complications infectieuses et des syndromes lympho-prolifératifs induits par le virus EBV.

Augmentation du nombre de cellules souches hématopoïétiques transplantées

Les travaux chez la souris ont clairement mis en évidence qu'il existait un lien entre le nombre de CSH à administrer pour assurer une prise du greffon et le degré de compatibilité entre le donneur et le receveur. La possi-

lité, pour un greffon de grande «taille», de surmonter une incompatibilité H-2 importante en présence d'une déplétion des lymphocytes T du greffon à été confirmée [35]. Les mécanismes en cause sont mal connus et pourraient être en relation avec un effet de compétition entre les cellules souches du donneur et du receveur et/ou la persistance après déplétion des lymphocytes T de populations immunes telles que des lymphocytes T résiduels ou cellules dendritiques. Reisner *et al.* ont donc augmenté le nombre de CSH transplantées dans le cadre de greffe haplo-identique (un haplotype HLA en commun) par l'adjonction au greffon médullaire d'un greffon de cellules souches périphériques, les deux greffons étant déplétés en lymphocytes T. Des résultats préliminaires suggèrent que cette approche permettrait effectivement une prise du greffon satisfaisante avec une incidence de GvH aiguë qui reste faible [36]. L'utilisation de CSH périphériques allogéniques avec déplétion ou non des lymphocytes T ouvre certainement de nouvelles perspectives dans le domaine de la greffe. Outre la démonstration dans un contexte autologue que ce type de greffon permet une prise de greffe plus rapide, il est possible que les lymphocytes T, présents dans ce type de greffon prélevé chez un individu prétraité par des facteurs de croissance hématopoïétique, soient moins alloréactifs que les lymphocytes T présents dans un greffon d'origine médullaire. En effet, plusieurs études cliniques utilisant des CSH allogéniques sans déplétion des lymphocytes T rapportent une incidence similaire (ou parfois moindre) de GvH aiguë alors que le nombre de lymphocytes T administrés dans ces circonstances est au moins 10 fois supérieur au nombre de lymphocytes T présents dans un greffon d'origine médullaire [1]. Une modification du profil cytokinique vers une réponse de type TH2 [37] (provoquée par l'administration *in vivo* de G-CSF) pourrait expliquer ces données. Dans un modèle murin, le prétraitement des donneurs par G-CSF conduit après la greffe à une réponse cytokinique de type TH2 avec une réduction de la sévérité de la GvH [38]. Dans un autre modèle, l'utilisation de lymphocytes T de phénotype cytokinique TH2 permet le contrôle de la GvH sans réduction

RÉFÉRENCES

36. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, Velardi A, Falzetti F, Giannoni C, Iaccuci R, Zei T, Martelli MP, Gambelunghe E, Rosetti M, Caputo P, Latini P, Aristei C, Raymondi C, Reisner Y, Martelli MF. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical « three loci » incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 1994; 84: 3948-55.
37. Hartung H, Döcke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, Volk HD, Wendel A. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on *ex vivo* blood cytokine response in human volunteers. *Blood* 1995; 85: 2482-9.
- 38 L. Delmonte J, Jalonene CK, Ferrara JLM. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) polarizes donor T lymphocytes toward type 2 cytokine production and reduces severity of experimental graft versus host disease. *Blood* 1995; 86: 4422-9.
39. Fowler DH, Kurasawa K, Smith R, Eckhaus MA, Gress RE. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft-versus-host disease without impairing allogeneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* 1994; 84: 3540-9.
40. Kaufman CL, Colson YL, Wren SM, Watkins S, Simmons RL, Ildstad ST. Phenotypic characterization of a novel bone marrow-derived cell that facilitates engraftment of allogeneic bone marrow stem cells. *Blood* 1994; 84: 2436-46.
41. Schiltz KR, Paquet J, Bader S, Hay Glass KT. Requirement for B cells and T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 289-95.
42. Cavazzana-Calvo M, Stephan JL, Sarnacki S, Chevret S, Fromont C, De Coene C, Le Deist F, Guy-Grand D, Fischer A. Attenuation of graft-versus-host disease and graft rejection by *ex vivo* immunotoxin elimination of alloreactive T-cells in an H-2 haplotype disparate mouse combination. *Blood* 1994; 83: 288-98.
43. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Caragna T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell depleted bone marrow transplants correlate with the development of GvHD. *Blood* 1986; 68: 770-3.
44. Verdonck LF, Dekker AW, De Gast GC, Van Kempen ML, Lokhorst HM, Nieuwenhuis HK. Allogeneic bone marrow transplantation with a fixed low number of T-cells in the marrow graft. *Blood* 1994; 83: 3090-6.
45. Johnson BD, Truitt RL. Delayed infusions of immunocompetent donor cells after bone marrow transplantation breaks graft-host tolerance and allows for persistent antileukemic reactivity without severe graft-versus-host disease. *Blood* 1996; 85: 3302-12.

de la prise de la greffe [39]. L'effet de cette polarisation de type TH2 sur la prise de la greffe, l'effet GvL et la GvH chronique justifiera toutefois des travaux complémentaires.

Meilleur ciblage de la déplétion des lymphocytes T

Une meilleure définition des populations immunes ciblées par les modes de déplétion *ex vivo* paraît important. Il a été récemment mis en évidence la présence au sein d'un greffon médullaire de cellules de phénotype CD3⁺, CD8⁺ mais TCRαβ et γδ négatives qui joueraient un rôle important dans la prise du greffon [40]. L'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur T devrait alors permettre une déplétion des lymphocytes T tout en sauvegardant cette population « facilitatrice ». En outre, la déplétion de populations immunes impliquées dans la présentation de l'antigène, tels que les lymphocytes B, pourrait avoir un intérêt non seulement dans la prophylaxie de la GvH [41] mais également dans la prévention des lymphomes induits par le virus EBV. Il a été également montré qu'une déplétion des lymphocytes synthétisant le récepteur de l'IL-2 au cours d'une culture mixte permettait une inhibition spécifique de la réponse allogénique [42].

Déplétion des lymphocytes T immédiate ou retardée

Un greffon médullaire contient approximativement de 1 à 2 × 10¹⁰ cellules nucléées avec environ 10 % à 15 % de lymphocytes T matures. Ainsi, le receveur d'un greffon médullaire reçoit de 1 à 2 × 10⁷ lymphocytes T/kg. Bien que la quantification des lymphocytes T résiduels après déplétion reste difficile, le seuil au dessous duquel le patient est protégé d'une GvH significative lors d'une greffe HLA-identique intrafamiliale est de 1 × 10⁵ lymphocytes T/kg [43]; cela équivaut à une déplétion des lymphocytes T abaissant leur nombre de cent fois. Ce seuil de lymphocytes T est évidemment beaucoup plus bas lors de greffe HLA nonidentique. Fondées sur ces données, des études utilisant

un nombre fixe de lymphocytes T ont été entreprises. Des greffons médullaires contenant 1 × 10⁵/kg de lymphocytes T (plus ciclosporine après transplantation) dans un contexte HLA-identique ont été associés à une absence de rejet, un taux de GvH aiguë de grade > I de 28 % (toutes de grade II) et de GvH chronique de 33 % [44]. Une étude similaire menée dans notre unité chez des patients plus âgés, a conduit à des conclusions identiques en matière de prise de la greffe et de prévention des GvH sévères avec, toutefois, la survenue de lymphomes associés au virus EBV dans 9,5 % des cas. L'absence de déplétion lymphocytaire B dans notre étude permet peut-être d'expliquer l'incidence élevée de cette complication.

Outre le nombre de lymphocytes T présents dans le greffon, d'autres paramètres tels que la disparité génétique entre le donneur et le receveur, le degré de réactivité immunologique propre à chaque patient, la toxicité du conditionnement et les infections virales sont aussi des facteurs déterminant le risque de GvH. Ainsi, il est probable que pour un même nombre de lymphocytes T, l'alloréactivité soit malheureusement variable pour chaque couple donneur/receveur.

L'administration d'une ou de plusieurs doses successives de lymphocytes T du donneur à distance d'une greffe de moelle osseuse avec déplétion des lymphocytes T est une approche expérimentale actuellement en cours d'évaluation chez l'homme. En effet, des modèles expérimentaux murins ont permis de montrer qu'une administration « retardée » (> 21 jours après la greffe) permettait de maintenir un effet GvL sans induire de GvH significative [45]. Des données préliminaires chez l'homme suggèrent que l'administration de 1 × 10⁵ lymphocytes T du donneur/kg deux mois après la greffe HLA-identique ne paraîtrait pas être associée à un risque de GvH; en revanche, cette complication est observée à partir de 1 × 10⁶ lymphocytes/kg.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'administration de lymphocytes T lors d'une rechute de leucémie myéloïde chronique après greffe de moelle osseuse permet d'obtenir dans plus de 75 % des cas une rémission

complète (disparition du transcrit *Bcr/Ab1*) et durable, avec une probabilité de rémission persistante à 3 ans supérieure à 85 % [46]. De façon attendue, ce succès est fréquemment associé à la survenue d'une GvH et/ou d'une aplasie médullaire. Cette dernière complication est d'autant plus fréquente et sévère que la maladie est évolutive. De plus, l'efficacité antileucémique paraît plus marquée si les lymphocytes T sont administrés précocement lors de la rechute. Ainsi, il est maintenant possible d'envisager, au moins dans la leucémie myéloïde chronique, une administration extrêmement précoce, voire prophylactique, chez des patients à haut risque de rechute, de lymphocytes T dont le nombre et le rythme d'administration tiendraient compte de l'état clinique du patient, du type de maladie, du délai après la greffe, et de la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur. Le risque de GvH paraît corrélé à la quantité de lymphocytes T administrée [47] et l'effet antileucémique est plus marqué chez les malades développant une GvH [42]. Toutefois, un effet GvL significatif peut être observé en l'absence de GvH [47]. Les variables telles que la quantité et le phénotype des lymphocytes T, le rythme d'administration, la place de cytokines telles que l'IFN- α , le GM-CSF, ou l'utilisation conjointe de CSH périphériques font actuellement l'objet d'investigations.

Utilisation de lymphocytes allogéniques T spécifiques de l'antigène

L'équipe de Brenner *et al.* a récemment montré que l'administration après greffe de moelle osseuse de lymphocytes T provenant du donneur et spécifiquement dirigés contre le virus EBV permettait la reconstitution d'une immunité anti-EBV avec, chez un patient présentant un lymphome EBV, l'obtention d'une réponse complète [48]. Un marquage génique de ces lymphocytes T a permis de montrer la persistance de ces cellules plus de 18 mois après injection. Il faut toutefois souligner que l'utilisation de lymphocytes T de même provenance (donneur séropositif pour l'EBV) mais directement administrés sans manipulation

ex vivo a été également utilisée avec succès chez des patients présentant un syndrome lymphoprolifératif induit par l'EBV [49].

Par ailleurs, une reconstitution de l'immunité cellulaire anti-CMV après greffe de moelle osseuse allogénique a été rendue possible par l'utilisation de clones CTL anti-CMV [50]. De telles approches cellulaires peuvent être également envisagées pour amplifier l'effet GvL avec l'utilisation de clones CTL dirigés contre des antigènes mineurs d'histocompatibilité d'expression restreinte ou des antigènes tumoraux.

L'immunisation du donneur (et du receveur après la greffe) contre des antigènes viraux et/ou tumoraux par l'administration d'un « vaccin » approprié ou, au contraire, de cellules dendritiques après stimulation antigénique, représente une potentialité thérapeutique importante. Récemment, Kwack *et al.* ont montré qu'il était possible d'induire une réponse T spécifique de l'idiotype chez un donneur et que cette immunité était transférable, lors d'une greffe de moelle osseuse allogénique, chez un patient porteur d'un myélome [51]. L'utilisation de cellules dendritiques du donneur, brièvement exposé à un peptide spécifique de la tumeur, permet d'induire une réponse immune antitumorale [52]. Ainsi, l'administration après la greffe de telles cellules dendritiques au donneur puis au receveur (probablement indispensable dans le contexte d'une déplétion des lymphocytes T [53]) constitue une piste intéressante. En l'absence d'antigène tumoral caractérisé, une élution des peptides présentés à la surface des cellules tumorales peut être envisagée. Enfin, il faut souligner que la capacité d'induire une réponse immune antitumorale chez un donneur sain (et/ou chez le receveur à distance de la greffe) est probablement bien meilleure que chez le patient dont l'immunocompétence peut être altérée [54]. Dans cette optique, on peut donc envisager que ces approches cellulaires spécifiques pourraient permettre, non seulement de compenser le déficit immunitaire et la perte de l'effet GvL associés à la déplétion des lymphocytes T du greffon, mais également de permettre un effet antitumoral (et/ou antiviral) spécifique.

Lymphocytes T génétiquement modifiés

L'introduction d'un gène codant pour un facteur de susceptibilité peut rendre une cellule cible sensible à un agent exogène habituellement non toxique [55]. Ce type de gène responsable de la transformation de prodrugs inactives en produit extrêmement toxique est parfois qualifié de « suicide ». Ainsi, l'enzyme thymidine kinase du virus Herpès-simplex-1 (HS-tk), est capable de phosphoryler certains analogues de nucléosides tels que le ganciclovir en nucléoside monophosphate. Celui-ci, après phosphorylation en nucléoside triphosphate par les tk cellulaires, sera incorporé dans une chaîne d'ADN d'une cellule en division avec blocage de l'élongation et mort cellulaire (*m/s n° 7, vol. 5, p. 517*). L'expression du gène *HS-tk* dans les lymphocytes T du donneur, administrés avec le greffon pourrait permettre pour la première fois un traitement immunosuppresseur *in vivo* spécifiquement dirigé contre ces lymphocytes T. Ainsi, une déplétion *in vivo* sélective de ces lymphocytes T par le ganciclovir serait possible s'il survenait une GvH. Par conséquent, l'effet bénéfique des lymphocytes T sur la prise du greffon et sur le contrôle antitumoral pourrait être conservé chez les patients ne présentant pas de GvH significative. A l'inverse, chez les patients présentant une GvH, une déplétion spécifique des lymphocytes T matures par le ganciclovir pourrait contribuer de façon significative au traitement de cette complication. De plus, cet effet spécifique, à l'inverse des traitements habituels de la GvH (corticoïdes, ciclosporine, sérum antilymphocytaire...) pourrait permettre de conserver les autres cellules immunes (notamment des lymphocytes T) issues de l'hématopoïèse après la greffe et tolérantes vis-à-vis de l'hôte. Ainsi, ce traitement pourrait être moins toxique, et réduire la fréquence et la gravité des complications infectieuses, cause principale de décès lors d'une GvH. Enfin, dans la mesure où les premiers signes de GvH apparaissent le plus souvent au-delà du dixième au quinzième jour après la greffe, un traitement par ganciclovir dans ces circonstances ne devrait pas empêcher le patient de bénéficier des effets précoces de ces lymphocytes T sur la prise du greffon et le contrôle de la maladie leucémique (*figure 2*).

RÉFÉRENCES

46. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, Van Rhee F, Mittermuller J, De Witte T, Holler E, Hansari H. Graft-versus-leukemia effect of donor T-lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86: 2041-50.
47. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Kernan NA, Small TN, Young JW, O'Reilly RJ. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 1995; 86: 1261-8.
48. Rooney CM, Smith CA, Ng CYC, Loftin S, Li CF, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE. Use of modified virus-specific T-lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13.
49. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, Mackinnon S, Boulad F, Carabasi MH, Castro-Malaspina H, Barret CH, Gillio AP, Small TN, Young JW, Kernan N, O'Reilly RJ. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330: 1185-91.
50. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333: 1038-44.
51. Kwack LW, Taub DD, Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL. Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet* 1995; 345: 1016-20.
52. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2: 52-8.
53. Kwack LW, Pennington R, Longo DL. Active immunization of murine allogeneic bone marrow transplant donors with B-cell tumor-derived idiotype: a strategy for enhancing the specific antitumor effect of marrow graft. *Blood* 1996; 87: 3053-60.
54. Levay DL, Srivasta PK. Alterations in T-cells of cancer-bearers: whence specificity. *Immunol Today* 1996; 17: 365-8.
55. Tiberghien P. Use of suicide genes in gene therapy. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 203-10.
56. Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, Spence S, Deschaseaux M, Certoux JM, Contassot E, Murphy WJ, Lyons R, Chiang Y, Longo DL, Hervé P, Ruscetti FW. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T-lymphocytes: an approach for specific *in vivo* donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* 1994; 84: 1333-41.
57. Bonini C, Verzeletti S, Servida P, Rossini S, Traversari C, Ferrari G, Nobili N, Mavilio F, Bordignon C. Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for *in vivo* immunomodulation after allo-BMT. *Blood* 1994; 84 (suppl 1): 110a.

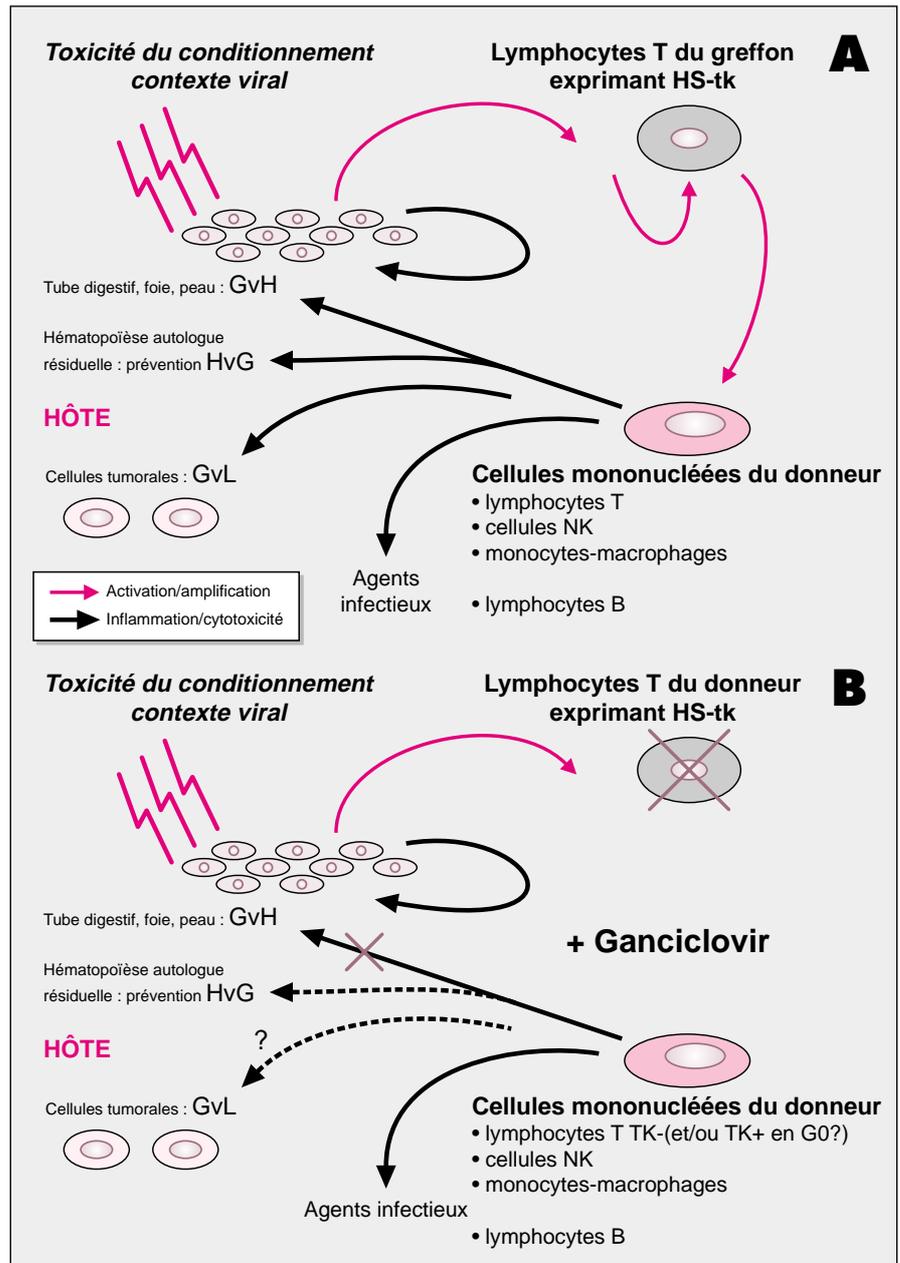


Figure 2. **Utilisation de lymphocytes exprimant le gène HS-tk lors de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) déplétées en lymphocytes: mécanisme d'action proposé.** L'incompatibilité tissulaire entre donneur et receveur après greffe de CSH, ainsi que « l'orage cytokinique » associé à la toxicité du conditionnement conduisent à l'activation et l'amplification d'une réponse immune alloréactive déclenchée par les lymphocytes T présents dans le greffon. Après amplification et recrutement d'effecteurs cytotoxiques, cette réponse allogénique va être dirigée contre: (1) les tissus sains (la GvH); (2) l'hématopoïèse résiduelle autologue, permettant une prévention du rejet de greffe; et (3) les cellules tumorales résiduelles (l'effet GvL) (adapté de Antin et Ferrara [16]). **A.** En l'absence de GvH, l'utilisation de lymphocytes T exprimant le gène HS-tk pourra permettre de conserver les effets bénéfiques de cette alloréactivité. **B.** En présence d'une GvH, un traitement par ganciclovir devrait permettre l'ablation des lymphocytes T administrés lors de la greffe et contribuer ainsi au traitement de la GvH, tout en conservant les autres populations immunes (cellules natural killer monocytes-macrophages, lymphocytes B, lymphocytes T TK+[en G0 lors du traitement par ganciclovir] ou TK-[issus de l'hématopoïèse postgreffe]) GvH: graft versus host reaction; HvG: host versus graft reaction; GvL: graft versus leukemia reaction; CSH: cellules souches hématopoïétiques.

Afin d'obtenir des lymphocytes T spécifiquement inhibés par le ganciclovir, nous avons infecté des lymphocytes T primaires avec un vecteur rétroviral contenant les gènes *HS-tk* et de résistance à la néomycine *NeoR(GITK1SVNa)* fabriqué par Genetic Therapy, Inc (Maryland, USA). Notre choix d'un système de transfert rétroviral a été dicté par la nécessité d'obtenir une intégration génomique du transgène. L'utilisation d'un gène *NeoR* permet la sélection des cellules effectivement infectées par culture des cellules en présence d'un dérivé de la néomycine (G418). Nous avons ainsi montré qu'il était possible d'obtenir, de façon reproductible et compatible avec un usage clinique, des lymphocytes T spécifiquement inhibés par le ganciclovir et ayant conservé leurs capacités de réponse vis-à-vis d'un mitogène ou d'un allo-antigène [56]. Nous avons récemment entrepris une étude clinique phase I-II évaluant la faisabilité, la toxicité et les effets d'une administration de lymphocytes T exprimant les gènes *HS-tk* et *NeoR* +/- ganciclovir en association à une greffe de moelle osseuse allogénique avec déplétion des lymphocytes T, chez des patients à haut risque de GvH. En fonction de la tolérance et de l'alloréactivité observées, une dose progressivement croissante de lymphocytes T est administrée. La survie, les capacités alloréactives et la sensibilité au ganciclovir des lymphocytes T infectés sont les principaux paramètres examinés.

A ce jour, cinq patients porteurs d'hémopathies malignes ont reçu, après un conditionnement associant endoxan, thiotépa et une irradiation corporelle totale, un greffon médullaire avec déplétion des lymphocytes T et 2×10^5 lymphocytes T génétiquement modifiés/kg (premier palier de dose) provenant d'un donneur intra-familial HLA identique. Aucun effet secondaire n'a été observé lors de l'administration des cellules infectées. La reconstitution hématopoïétique s'est faite de façon satisfaisante chez les trois patients. Les analyses par PCR ont permis de montrer la circulation de cellules génétiquement modifiées au moins jusqu'à J100 (dernière date analysée) avec la présence de lymphocytes résistants au G418 et sensibles au ganciclovir.

La place de lymphocytes T exprimant un gène *HS-tk* dans le traitement de lymphome associé au virus EBV ou la rechute d'hémopathie après la greffe de CSH est en cours d'évaluation par Bordignon *et al.* [57]. Dans ce contexte, une GvH cutanée et hépatique sensible au ganciclovir a été rapportée chez deux patients.

L'utilisation de tels lymphocytes T génétiquement modifiés pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'extrême alloréactivité associée à la greffe de moelle intrafamiliale HLA non identique rend cette thérapeutique très difficile à réaliser. Cette difficulté est d'autant plus regrettable que l'on dispose en général toujours d'un donneur haplo-identique dans la famille d'un patient. L'administration de lymphocytes T exprimant le gène *HS-tk* avec un traitement systématique par ganciclovir aux environs de J10 à J15 après la greffe, c'est à dire après la prise médullaire et avant la survenue de la GvH, permettrait peut-être une prévention de la GvH, tout en conservant le bénéfice des lymphocytes T dans la phase précoce de la greffe sur la prise du greffon.

Conclusion

La réactivité allogénique reste en 1996 la pierre angulaire de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Une prévention efficace de la GvH, associée à une conservation, voire à une augmentation de l'effet GvL et à une absence de rejet de la greffe permettraient à la greffe de CSH de prendre un essor considérable, en particulier en situation de compatibilité HLA partielle. En permettant de mettre « les compteurs à zéro » sans utilisation d'immunosuppresseurs après la greffe, la déplétion des lymphocytes T du greffon constitue un excellent point de départ pour une greffe pouvant alors incorporer, à des titres divers et selon l'affection sous-jacente et la compatibilité HLA, une immunisation du donneur et/ou receveur, une immunothérapie adoptive non spécifique ou spécifique dirigée vis-à-vis d'antigènes viraux ou tumoraux. L'intégration de ces techniques de thérapie cellulaire et génique dans le processus de greffe, devenu alors polymorphe et « progressif », devrait nous permettre d'accroître de façon significative l'effet thérapeutique d'un outil immunologique tout à fait remarquable : la réactivité allogénique ■

Summary

Modulation of allogeneic reactivity after hematopoietic stem cells transplantation

An allogeneic hematopoietic graft comprises stem cells capable of multilineage hematopoietic reconstitution as well as mature immunocompetent T lymphocytes capable of recognizing the host as foreign. This alloréactivity is responsible on one hand of a deleterious effect: graft-versus-host disease (GvHD), and on the other hand of favorable effects with enhanced engraftment and an especially potent antitumor effect: the graft-versus-leukemia (GvL) effect. The T-lymphocytes present in the graft, HLA compatibility, cytokine environment at time of transplantation play a major role in this alloréactivity. Increased knowledge of the on-going immunological interactions as well as the development of cellular therapy approaches are instrumental for further expansion of post-transplantation alloréactivity as an important immunotherapy tool. By allowing successful GvHD prevention and various post-transplantation immunological interventions, T-cell depletion of the graft is the starting point of a transplantation procedure which is now polymorphic and adapted to recipient disease, HLA compatibility, desired anti-tumor effects and observed alloréactivity.