

« Université de Franche-Comté – UFR de Médecine et de Pharmacie »

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**

Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

**Etude de l'impact de la mobilisation des Cellules Souches  
Périphériques (CSP) mobilisées par le facteur de  
croissance des granulocytes (G-CSF) sur les donneurs  
sains et les receveurs après allogreffe de CSP à  
conditionnement non myélo-ablatif**

THESE

N° 25 / 08 / 11

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 décembre 2008

Par **Caroline MARMIER-SAVET**

En vue du grade de **Docteur de l'Université de Franche-Comté**

**Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé**

**Directeur de thèse : Dr Eric ROBINET**

JURY

Pr Agnès BUZYN (rapporteur)

Pr Jean Luc BRESSON

Pr Jean Pierre JOUET (rapporteur)

Dr Eric ROBINET

Dr Luc SENSEBE



## **Serment éthique des Chercheurs en Sciences de la Vie**

(D'après JM. Pelt, GE. Séralini et E. Morin)

« Je jure d'être fidèle à l'éthique du respect des personnes et des vies humaines et de contribuer au développement de la connaissance et à la plus large diffusion du savoir.

Je respecterai toutes les espèces dans leur biodiversité : ce respect inspirera mes actes et mes projets, notamment au cours de mes expérimentations sur les animaux ou les tissus humains.

Je m'efforcerai de soulager les souffrances de tous les êtres vivants.

Admise à avoir accès à l'intimité tissulaire ou génétique des personnes, je tairai leur identité et m'astreindrai au secret médical.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je m'informerai et réfléchirai au sens de mes expérimentations et à leurs connaissances.

Je veillerai à ce que mes travaux et recherches ne soient pas utilisés à des fins de destruction ou de manipulation.

Je respecterai les savoirs des ethnies et des sociétés traditionnelles.

Je n'aurai garde d'oublier mes responsabilités à l'égard des générations présentes et futures.

Je n'accepterai pas que des considérations de nationalités, de culture, de politiques ou d'avantages matériels me détournent de mes devoirs.

J'interviendrai pour défendre, s'il m'en est donné l'occasion, l'ensemble de ces règles.

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

Que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque. »



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean Luc BRESSON de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Agnès BUZYN et au professeur Jean Pierre JOUET pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi qu'au Docteur Luc SENSEBE pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie le Professeur Pierre TIBERGHIEU de m'avoir accueillie dans son équipe et permise de réaliser ce travail durant ces 5 années. Merci de m'avoir encouragée dans les moments de doute.

Je tiens à remercier le Docteur Eric ROBINET sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Ton soutien, tes encouragements, tes connaissances et tes conseils m'ont été nécessaires et bénéfiques durant ces 5 années parsemées d'angoisses et d'embûches.

Je remercie la Région Franche Comté et la Fondation Transplantation pour leur soutien financier durant ce doctorat, mais également l'Etablissement Français des Greffes, la Ligue contre le Cancer comité du Doubs, l'INSERM et l'EFS qui ont soutenu le projet « Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisées par G-CSF ».

J'adresse un grand, énorme merci à Pascale LOUVAT pour la gestion et la logistique de l'étude. Travailler avec toi à été un grand plaisir, ton expérience,



tes connaissances et ta disponibilité m'ont été essentielles. Ce travail n'aurait pas été le même sans ta présence indispensable.

Je remercie Marc PUYRAVEAU pour avoir réalisé la base de données dans laquelle tous les résultats biologiques ont été doublement saisis.

Merci à toute l'équipe du laboratoire HLA (Jacqueline, Marie-France, Chantal, Isabelle, Nadège, Mireille, Brigitte, Alain et Emeline), d'abord pour les donneurs que vous avez permis d'inclure dans cette étude, mais également pour les pauses café / gâteaux de 10h. J'espère que le sevrage en galettes ne sera pas trop difficile pour vous.

Merci à tous les membres actuels et anciens de l'unité INSERM 645 et notamment le personnel du TIM pour leur soutien et leur aide. Merci particulièrement au Dr Christophe FERRAND, au Pr Philippe SAAS, au Pr Christophe BORG, au Dr Béatrice GAUGLER, au Dr Francine GARNACHE - OTTOU et au Pr Estelle SEILLES pour leurs conseils dans leurs domaines respectifs que peuvent être la biologie moléculaire, l'immunologie ou l'hématologie...

Merci beaucoup à ceux qui ont réussi à cohabiter, de près ou de loin, avec moi durant ses nombreuses années : Anne, Nico, Carole, Fanny, Sabeha, Pat, J.R., Francis, Sylvain, Zohair, Emad, Rachid, Idir, Jean-Marie, Romain, Jérémy, Jean-Paul, Jamal, Cécile, Bérengère, Aline, les filles de la plateforme de biomonitoring... et tous ceux que j'aurais oublié (pardon mille fois).

Un énorme merci à mes nouveaux collègues de la Fondation Transplantation et du CIC de Besançon (Pr Jean-Marc CHALOPIN, Pr Jacques MASSOL, Dr





Lionel PAZART, Chrystelle, Francès, Franck) qui ont acceptés que je prenne un peu sur mon temps pour terminer ce travail.

Je remercie ma famille qui a su me soutenir sur cette route semée de doutes et d'embuches. Une pensée particulière à mon papa qui nous a quittés avant la soutenance de ce travail et qui était si fier de dire que sa fille travaillait dans la recherche.

Enfin, une énorme pensée à Loulou qui a du me supporter durant toutes ses années de fac avec des moments vraiment difficiles surtout aux périodes de partiels. Merci d'être resté auprès de moi et d'avoir su attendre que mon caractère s'assouplisse enfin. Cette aventure que nous vivons tous les deux est à présent merveilleuse, bien que parfois imprévisible, et le sera encore plus avec l'arrivée de notre petit bout.



# Table des matières

Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
<b>INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>I L'hématopoïèse</b>	<b>15</b>
A Le micro-environnement médullaire	15
1 Généralités	15
2 Composition	15
B Les compartiments de l'hématopoïèse	16
1 La cellule souche hématopoïétique (CSH) ou cellule souche multipotente	18
2 Les progéniteurs hématopoïétiques	18
3 Les précurseurs hématopoïétiques	19
4 Les cellules matures	19
C La régulation de l'hématopoïèse	20
D La différenciation granulocytaire ou granulopoïèse	21
1 Les différentes étapes	21
2 La régulation de la granulopoïèse neutrophile	22
<b>II La greffe de cellules souches hématopoïétiques</b>	<b>23</b>
A Les différents types de greffe de cellules souches hématopoïétiques	23
B Les sources de cellules souches hématopoïétiques des greffons allogéniques	25
1 La moelle osseuse	25
2 Les cellules souches périphériques mobilisées par un facteur de croissance	26
3 Le sang de cordon	26
4 Choix de la source de CSH	27
C Les différents conditionnements du patient	28
D L'alloréactivité des cellules hématopoïétiques	30
1 L'effet Greffon contre Leucémie (GVL)	31
2 L'effet Hôte contre Greffon (HVG)	32



3 La réaction du Greffon contre l'Hôte (GVH)	33
4 Complications infectieuses	35
E La reconstitution hématopoïétique	35
<b>III La greffe de cellules souches périphériques</b>	<b>37</b>
A Structure et fonction du couple G-CSF / G-CSF-R	37
1 Structure du G-CSF	37
2 Les différents types de G-CSF	38
a Le filgrastim	38
b Le lénograstim	38
c Le peg-filgrastim	39
3 Récepteur du G-CSF	39
a Présentation du récepteur	39
b Mutations du récepteur	40
4 La voie de signalisation G-CSF – G-CSF-R	41
5 Indications thérapeutiques	43
6 Contre-indications du G-CSF	43
7 Effets secondaires	44
8 Utilisations du G-CSF	45
a Mobilisation des cellules souches périphériques par G-CSF	45
b Traitement par G-CSF	46
B Impact de la mobilisation par G-CSF sur le donneur sain	46
1 Les numérations sanguines	46
2 Risque de transformation leucémique	47
C Effets immunologiques de la mobilisation par G-CSF sur le receveur	49
D Caractérisation quantitative et qualitative du greffon de CSP	50
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>52</b>
<b>I Rationnel du projet de recherche</b>	<b>53</b>
<b>II Projet de recherche</b>	<b>54</b>



## **MATERIELS ET METHODES \_\_\_\_\_ 55**

### **I Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisés par G-CSF \_\_\_\_\_ 56**

A Description de l'étude _____	56
B Les donneurs _____	58
C Les échantillons biologiques _____	58
D Numération des cellules sanguines _____	58
E Analyse en cytométrie en flux des marquages membranaires _____	59
F Quantification de cytokines _____	59
G Quantification des immunoglobulines _____	60
H Analyses cytogénétiques : FISH _____	60
1 FISH : Fluorescent In Situ Hybridization _____	60
a Préparation des échantillons _____	60
b Hybridation _____	61
c Lecture et analyse _____	61
2 Caryotype _____	62
a Préparation des échantillons _____	62
b Marquage des bandes G et R _____	62
c Lecture des lames, classification des chromosomes _____	62
I Analyses statistiques _____	62

### **II Etude de la reconstitution immunitaire après greffe de CSP \_\_\_\_\_ 63**

A Les patients _____	63
B Les donneurs _____	64
C Numération des cellules et immunomarquages _____	66
D Quantification des TREC _____	67
E Analyse du chimérisme _____	67

## **RESULTATS \_\_\_\_\_ 69**

### **I Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisées par G-CSF \_\_\_\_\_ 70**

A Description des donneurs _____	70
B Evolution des numérations cellulaires _____	72
C Analyse des sous populations lymphocytaires _____	75
D Quantification des cytokines _____	79





E Quantification des immunoglobulines	81
F Analyses cytogénétiques	82
<b>II Etude de la reconstitution immunitaire après greffe de CSP</b>	<b>85</b>
A Suivi post greffe des patients	85
B Reconstitution immunitaire	88
C Reconstitution des cellules T CD8+	90
D Reconstitution des cellules T CD4+	92
<b>DISCUSSION</b>	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>102</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>111</b>



# Liste des figures

## INTRODUCTION

Figure 1: Compartiments de la moelle osseuse.....	16
Figure 2 : Schéma de l'hématopoïèse .....	17
Figure 3 : Les progéniteurs du polynucléaire neutrophile .....	22
Figure 4 : Répartition des diagnostics (hémopathies) chez les 2133 malades ayant reçu une autogreffe de CSH en 2007 et pour lesquels le diagnostic est connu .....	24
Figure 5 : Répartition des indications thérapeutiques des allogreffes de CSH en 2007 ..	25
Figure 6 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques non apparentées utilisées en France.....	27
Figure 7 : Structure du récepteur au G-CSF.....	40
Figure 8 : Représentation schématique du complexe G-CSF / G-CSF-R.....	41
Figure 9 : Voies de signalisation JAK 1 / STAT 5 mise en jeu par le couple G-CSF / G-CSF-R.....	42

## MATERIELS ET METHODES

Figure 10 : Représentation schématique du déroulement de l'étude .....	57
--	----

## RESULTATS

Figure 11 : Numérations plaquettaires.....	72
Figure 12 : Représentation des numérations érythrocytaires et du taux d'hémoglobine	73
Figure 13 : Numérations des globules blancs, polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes et lymphocytes .....	74
Figure 14 : Numérations des cellules CD3+, CD4+ et CD8+ et ratio CD4+/CD8+ .....	75
Figure 15 : Numérations des lymphocytes B et des cellules NK .....	76
Figure 16 : Numérations des lymphocytes, de type régulateur, Tr1 (CD4+ CD18+ CD49b+) et CD4+ CD25+ .....	77
Figure 17 : Numération des cellules dendritiques (PDC et MoDC) et ratio PDC / MoDC .....	78



<b>Figure 18 : Concentrations d'IL-2 et d'IL-10 synthétisées par les lymphocytes T en réponse à une stimulation de 24 heures par PHA .....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 19 : Concentration d'IL-8 synthétisée par les lymphocytes T en réponse à une stimulation par PHA .....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 20 : Concentrations d'IgG (a) et d'IgM (b) sécrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation de 14 jours par du pokeweed mitogen .....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 21 : Représentation des pourcentages de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17 .....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 22 : Photo d'un noyau métaphasique normal et d'un noyau non métaphasique triploïde pour le chromosome 17 .....</b>	<b>84</b>
<b>Figure 23 : Numérations des cellules lymphocytaires (a) et CD3+ (b) .....</b>	<b>88</b>
<b>Figure 24 : Représentation des numérations des cellules CD4+ (a), CD8+ (b) et du ratio CD4+ / CD8+ .....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 25 : Numérations des cellules NK CD56+ (a) et des lymphocytes B CD19+ (b)...</b>	<b>90</b>
<b>Figure 26 : Numérations des lymphocytes CD8+ CD57+ (a) et des lymphocytes CD8+ HLADR+ (b) .....</b>	<b>91</b>
<b>Figure 27 : Nombre de copies de TRECs, exprimé en copies de TREC par 10<sup>6</sup> copies de GAPDH .....</b>	<b>93</b>



## Liste des tableaux

### INTRODUCTION

Tableau 1 : Exemple de conditionnements myélo-ablatifs utilisés en France ..... 29

Tableau 2 : Exemple de conditionnements non myélo-ablatifs utilisés en France ..... 30

### MATERIELS ET METHODES

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour le phénotypage des cellules obtenues pour chaque prélèvement ..... 59

Tableau 4 : Caractéristiques des patients et de leurs donneurs ..... 65

Tableau 5 : Séquences des sondes et amorces utilisées pour la quantification des gènes TREC et GAPDH ..... 67

### RESULTATS

Tableau 6 : Caractéristiques des donneurs de CSP inclus ..... 71

Tableau 7 : Valeur de référence et facteur d'induction des pourcentages de cellules monosomiques, trisomiques et multisolomiques pour les chromosomes 8 et 17. .... 83

Tableau 8 : Caractéristiques post transplantation des patients ..... 87

Tableau 9 : Pourcentage (moyenne  $\pm$  déviation standard) des types cellulaires : mémoire précoce, naïf, mémoire tardif, effecteur parmi les cellules CD8+ à différents temps post transplantation ..... 91





## Liste des abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
Akt	: protéine kinase B
APC	: allophycocyanin
ARN	: acide ribonucléique
ATG	: globulines anti thymocytaire
Bu	: busulfan
CCPPRB de Besançon	: comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale
CD	: cluster de différenciation
CEP	: centromere enumeration probe
CFU-GM	: colony forming unit granulocyte-macrophage
CHO	: lignée ovarienne de hamster chinois
CHU	: centre hospitalier universitaire
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	: cytomégalovirus
CRH	: cytokine receptor homolog
CSA	: cyclosporine
CSF-3	: colony stimulating factor 3
CSH	: cellules souches hématopoïétiques
CSP	: cellules souches périphériques
CXCR4	: CXC chemokine receptor
Cy	: cyclophosphamide
DAPI	: di amino phenyl indol
DLI	: donor lymphocyte infusion
dNTP	: desoxynucléotidetriphosphate
EBV	: Epstein-Barr virus
EDTA	: éthylène-diamine-tétraacétique
ERK	: extracellular signal-related kinases
FISH	: fluorescent in situ hybridization
FITC	: fluorescein isothiocyanate
FN III	: domaine homologue à la fibronectine de type 3



GAPDH	: glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
G-CSF	: granulocyte colony stimulating factor
G-CSF-R	: granulocyte colony stimulating factor receptor
GM-CSF	: granulocyte macrophage colony stimulating factor
GVH	: graft versus host
GVL	: graft versus leukemia
HLA	: human leukocyte antigen
HRP	: horseradish peroxidase
HVG	: host versus graft
ICT	: irradiation corporelle totale
IFN	: interféron
Ig	: immunoglobuline
IL	: interleukine
JAK	: janus kinase
JNK	: c-jun NH <sub>2</sub> -terminal kinases
kDa	: kilo daltons
kg	: kilogramme
LDH	: lactate déhydrogénases
LIN	: lineage
m <sup>2</sup>	: mètre carré
MAPK	: mitogen activated protein kinase
M-CSF	: monocyte colony stimulating factor
Mel	: melphalan
mg	: milligramme
MgCl <sub>2</sub>	: chlorure de magnésium
MMF	: mycophénolate motéfil
MoDC	: cellule dendritique d'origine monocytoïde
NK	: natural killer
P	: prélèvement
p38	: protéine de 38 kDa
PCR	: polymerase chain reaction
PDC	: cellule dendritique d'origine plasmocytoïde
PDK1	: 3-phosphoinositide-dependent proteine kinase
PE	: phycoerythrin



PE-Cy7	: phycoerythrin cyanin 7
PEG	: polyéthylène glycol
PerCP	: peridinin chlorophyll protein
PHA	: phytohémagglutinine
PI3-kinase	: phosphatidyl inositol 3 kinase
SDF-1	: stromal cell derived factor 1
SFGM	: société française de moelle osseuse
SSC	: standard saline citrate
STAT	: signal transducer and activators of transcription
STR	: short tandem repeat
SVF	: sérum de veau fœtal
TCR	: T cell receptor
TNF	: tumor necrosis factor
TREC	: T cell receptor excision circles



# **INTRODUCTION**





# ***L'hématopoïèse***

---

L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des mécanismes de prolifération et de différenciation qui conduisent à la production continue et régulée de cellules sanguines fonctionnelles et matures.

Le tissu hématopoïétique est régulé par un système complexe de facteurs de croissance et d'inhibiteurs dans un milieu très adapté : le micro-environnement médullaire.

## **A Le micro-environnement médullaire**

### ***1 Généralités***

Malgré la dispersion anatomique de la moelle osseuse, il existe une unité structurale et fonctionnelle qui permet de réunir les différents territoires osseux en un organe médullaire dont la fonction est d'assurer la multiplication et la différenciation des cellules sanguines. Tous ces processus sont étroitement contrôlés par les cellules stromales de la moelle osseuse et le micro-environnement médullaire *via* des facteurs de croissance et des molécules d'adhérence.

### ***2 Composition***

La moelle osseuse est constituée de plusieurs compartiments (**figure 1**).

#### ➤ **Le compartiment vasculaire :**

Le système vasculaire médullaire est complexe et est essentiellement composé par les sinus et l'arbre sinusoidal, unité élémentaire structurale et fonctionnelle de la moelle.

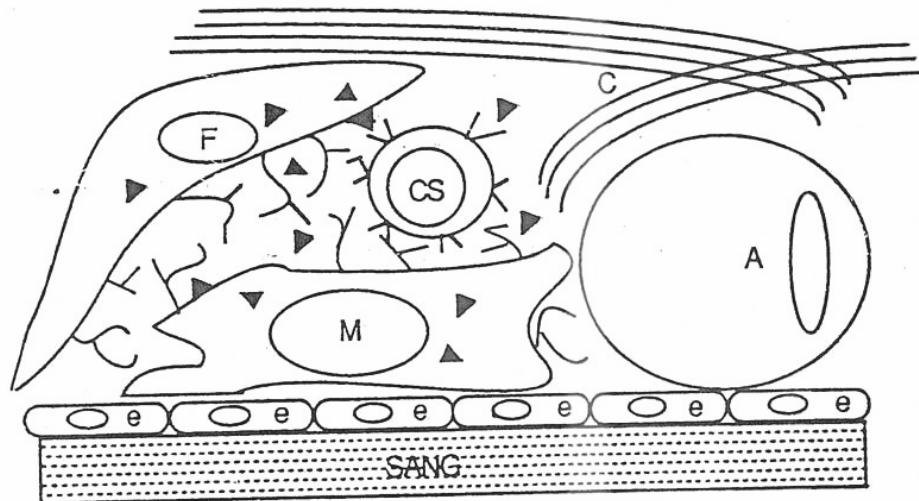
#### ➤ **La barrière médullosanguine :**

La barrière médullosanguine est constituée par la paroi des sinus, zone essentielle d'échange entre le sang et les territoires hématopoïétiques. Elle est composée de cellules endothéliales essentiellement, de cellules adventicielles et d'histiocytes macrophagiques.

## ➤ La matrice conjonctive ou stroma médullaire

Elle est composée :

- d'une matrice cellulaire formée par différents types cellulaires tels que les histiocytes, les cellules interstitielles non phagocytaires, les adipocytes et de terminaisons nerveuses.
- d'une matrice extracellulaire composée de fibres dont les constituants protéiques sont de type collagénique ou non.



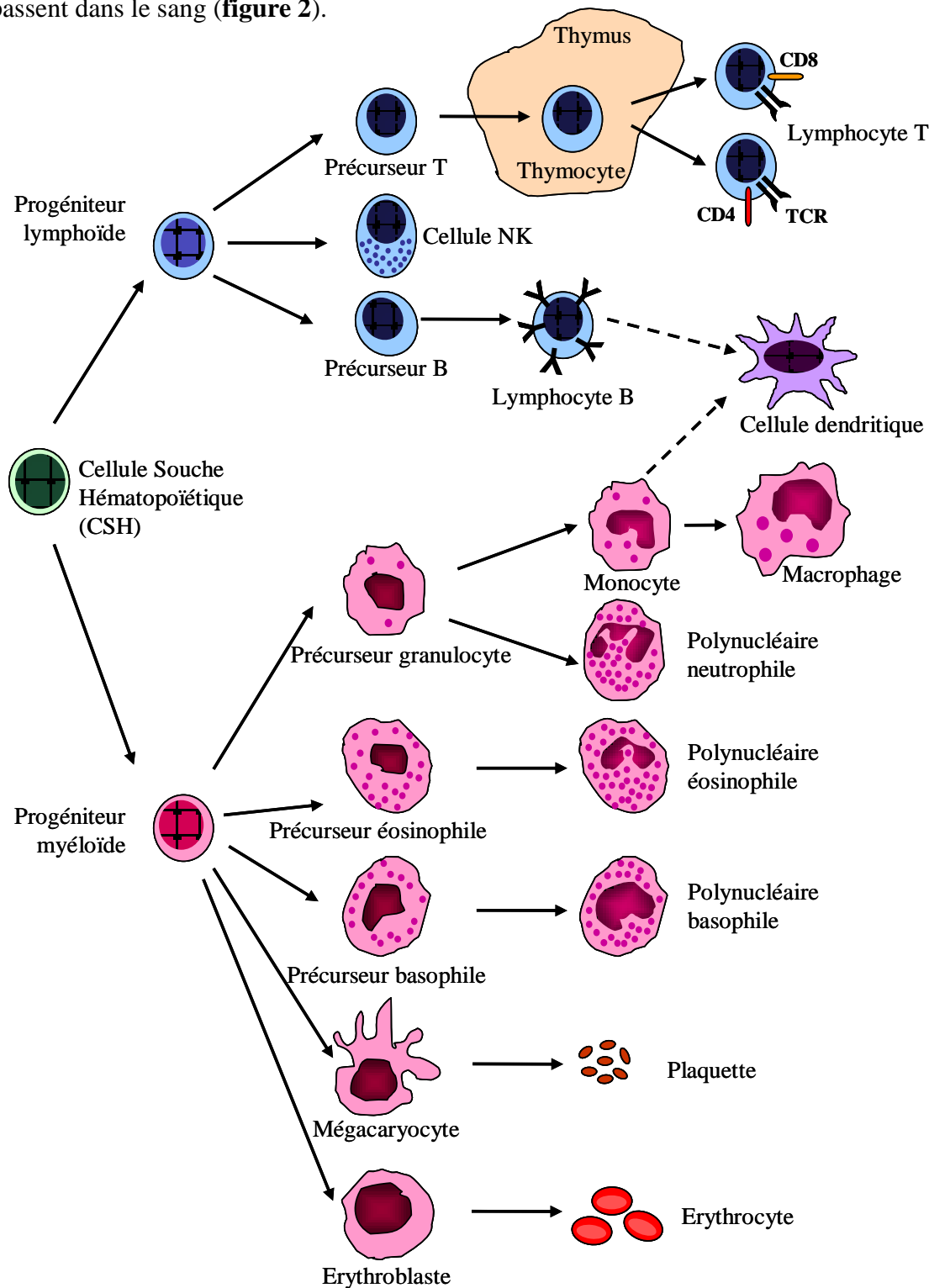
**Figure 1: Compartiments de la moelle osseuse**

La moelle osseuse est composée de 3 compartiments : le compartiment vasculaire composé de réseaux complexes de vaisseaux sanguins, la barrière médullo-sanguine composée essentiellement de cellules endothéliales (e) et la matrice conjonctive composée d'adipocytes (A), de fibroblastes (F), de cellules souches (CS), de macrophages (M) et de fibres collagène (C). Dans la matrice conjonctive, il y a également des facteurs de croissance (triangles noirs) et la matrice extra-cellulaire (petites fibres ramifiées). Schéma tiré d'un document de l'université de Lyon 1 ([http://www.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.util.LectureFichiergw?ID\\_FICHE=195938&OBJET=0017&ID\\_FICHIER=117089%20-](http://www.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif.util.LectureFichiergw?ID_FICHE=195938&OBJET=0017&ID_FICHIER=117089%20-))

## **B Les compartiments de l'hématopoïèse**

Toutes les cellules sanguines (hématies, polynucléaires, monocytes, lymphocytes et plaquettes) sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule multipotente ou primitive qui va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Elle devient alors un progéniteur (= cellule souche différenciée ou "engagée"). Après plusieurs divisions qui aboutissent à des cellules souches engagées au potentiel de différenciation de plus en plus limité, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée. On aboutit alors aux

précurseurs qui se divisent et maturent pour donner les cellules matures fonctionnelles qui passent dans le sang (**figure 2**).



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

La cellule multipotente se divise et se différencie en progéniteurs lymphoïde ou myéloïde. Ces derniers vont eux aussi se différencier pour donner divers types cellulaires. La cellule progénitrice lymphoïde donne naissance aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+, NK et B, mais aussi aux cellules dendritiques de type plasmacytoïde (PDC), monocytes, en macrophages, en plaquettes ou en hématies ; mais elle peut également produire les cellules dendritiques de type monocytoïde (MoDC).

## ***1 La cellule souche hématopoïétique (CSH) ou cellule souche multipotente***

Les cellules souches ont été mises en évidence dès le début des années 60 dans un modèle murin (Till *et al.*, 1961).

Les cellules souches multipotentes possèdent deux propriétés essentielles :

- L'auto-renouvellement, c'est-à-dire la capacité de multiplication à l'identique sans différenciation qui permet de maintenir une réserve constante de CSH primitives.
- La différenciation, c'est-à-dire, la possibilité, sous l'influence de facteurs de croissance, de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers une ou plusieurs lignées. La cellule perd alors sa multipotence pour devenir une cellule souche engagée.

Lors d'une hématopoïèse normale il existe un équilibre entre la production des cellules souches par division cellulaire (auto-renouvellement) et la perte des cellules souches par engagement vers les lignées cellulaires (différenciation).

Les CSH possèdent certains marqueurs immunologiques. Le marqueur principal, mais cependant pas spécifique, est le CD34. L'utilisation d'autres marqueurs (marquage positif ou négatif) en association avec le CD34 permet une meilleure caractérisation des CSH (Terstappen *et al.*, 1991).

La population de CSH est hétérogène, et les régulations qui conduisent au maintien du pool de CSH restent mal définies, deux hypothèses ont cependant été décrites. La première est basée sur l'existence d'un nombre fini de CSH établi au stade embryonnaire. La seconde, privilégiée aujourd'hui, consiste en l'existence d'une petite population cellulaire ayant une importante capacité d'auto-renouvellement. Les mécanismes de régulation de ces divisions sont complexes et restent mal connus.

## ***2 Les progéniteurs hématopoïétiques***

Ces cellules sont engagées dans une ou plusieurs voies de différenciation et leur capacité d'auto-renouvellement sont réduites.

Morphologiquement, les progéniteurs ne sont pas reconnaissables, ils ont été mis en évidence par culture en milieu semi-solide et en présence de facteurs de croissance adaptés (Bradley *et al.*, 1966).

La première différenciation d'une cellule souche multipotente peut se faire vers la lignée lymphoïde ou vers la lignée myéloïde.

La cellule progénitrice lymphoïde possède la potentialité de différenciation vers les différents types de lymphocytes (T, B et NK).

La cellule progénitrice myéloïde, capable de donner des colonies granulocytaire, érythrocytaire, monocyttaire ou mégacaryocytaire va poursuivre son programme de différenciation et donner naissance à des progéniteurs encore plus engagés.

Les progéniteurs perdent progressivement leur capacité d'autorenouvellement au fur et à mesure de leur avancement dans la différenciation, ils restent peu nombreux.

### ***3 Les précurseurs hématopoïétiques***

Les précurseurs représentent le dernier stade de la maturation des cellules hématopoïétiques. Ce sont des cellules morphologiquement identifiables qui ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement.

Dans la moelle osseuse, les précurseurs vont subir deux phénomènes simultanés : la maturation et la multiplication. En effet, les cellules subissent certaines modifications au niveau de leur taille, de leur chromatine, de leur composition en organites. Parallèlement, à chaque stade cytotologique correspond une division cellulaire.

### ***4 Les cellules matures***

La maturation des précurseurs conduit à la formation de cellules circulantes matures, qui peuvent passer dans le sang, telles que :

- les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles
- les monocytes et macrophages
- les lymphocytes

- les érythrocytes
- les thrombocytes

Pour la plupart de ces cellules le sang ne représente qu'un lieu de passage et de transport entre leur lieu de production (la moelle) et le lieu de leurs fonctions (les tissus).

## **C La régulation de l'hématopoïèse**

La régulation de l'hématopoïèse est complexe (Nardi *et al.*, 1999), et fait intervenir de nombreux phénomènes :

- **Le micro-environnement médullaire** qui joue un rôle crucial dans la régulation. Il existe un contact étroit entre la moelle et les cellules hématopoïétiques ; en effet, les cellules du micro-environnement médullaire produisent la majeure partie des molécules nécessaires à la différenciation ou à la prolifération des cellules hématopoïétiques.

- **Les vitamines**

- **Les facteurs de croissance hématopoïétiques** indispensables à la différenciation, à la maturation, à la multiplication et à la survie des cellules hématopoïétiques. De nombreux facteurs ont été découverts, clonés et synthétisés et certains sont utilisés en thérapeutique.

On distingue schématiquement 3 familles de facteurs de croissance :

- Les facteurs de promotion agissant sur les cellules les moins déterminées.
- Les facteurs multipotents agissant sur les cellules multipotentes et les progéniteurs les plus différenciés.
- Les facteurs restreints agissant sur les stades les plus tardifs de la différenciation et étant relativement spécifiques : ce sont principalement le G-CSF, le M-CSF...

- **Les récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétiques**

Deux familles de récepteurs ont ainsi pu être distinguées : les récepteurs à activité tyrosine – kinase et les récepteurs de la superfamille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques.

- **Le contrôle génique**

## **D La différenciation granulocytaire ou granulopoïèse**

La granulopoïèse est l'ensemble des mécanismes médullaires qui concourent à la formation des granulocytes, regroupant les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Leurs noms dérivent de la présence de granulations dans leur cytoplasme, granules réagissant avec des colorants acides (éosinophiles), basiques (basophiles) ou les deux (neutrophiles).

Le processus de maturation des granulocytes nécessite environ 10 jours et, chez une personne adulte saine,  $5 \cdot 10^{10}$  à  $10^{11}$  neutrophiles sont produits par jour.

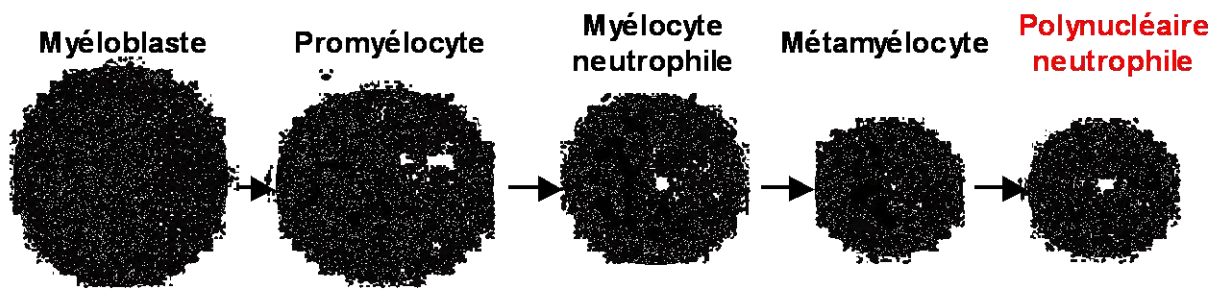
### ***1 Les différentes étapes***

Lors de la maturation dans la moelle, le neutrophile passe par différents stades de différenciation et de maturation avant de devenir un neutrophile mature.

- Les progéniteurs des neutrophiles sont les CFU-GM. Ils ne peuvent être visualisés et quantifiés que par des techniques de culture de progéniteurs hématopoïétiques.
- Les précurseurs comportent 4 stades cytologiques (Bainton *et al.*, 1971) (**figure 3**):
  - le myéloblaste : cette cellule à un diamètre de 20 à 25  $\mu$ , elle possède 2 à 5 nucléoles et quelques granulations rouges dites azurophiles dans le cytoplasme ce qui donne à cette cellule un caractère basophile.
  - le promyélocyte : cette cellule à un diamètre de 20  $\mu$  et de nombreuses granulations azurophiles lui donnant un caractère basophile.
  - le myélocyte neutrophile : c'est une cellule de 15  $\mu$  de diamètre. De nouvelles granulations dites spécifiques viennent s'ajouter aux premières. Les granulations de cette cellule ont les mêmes caractères que celles du polynucléaire neutrophile.
  - le métamyélocyte : Cette cellule diffère de la précédente que par l'aspect de son noyau qui prend l'aspect réniforme.

Tous ces précurseurs restent exclusivement dans la moelle osseuse.

- Les polynucléaires neutrophiles



**Figure 3 : Les progéniteurs du polynucléaire neutrophile**

Les 4 stades cytologiques des progéniteurs du polynucléaire neutrophile sont schématisés : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte neutrophile et métamyélocyte. Le polynucléaire neutrophile est également représenté. Schéma modifié d'après un document de l'université de Tours (<http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A15.pdf>)

## ***2 La régulation de la granulopoïèse neutrophile***

Plusieurs molécules interviennent, à différents stades, dans la régulation de la granulopoïèse.

### ➤ **Les facteurs de croissance :**

Ils agissent directement ou indirectement sur la prolifération et la différenciation granulomonocytaire. Les facteurs de croissance spécifiques de cette voie sont le GM-CSF et plus particulièrement le G-CSF. L'IL-3 et le GM-CSF agissent, dès les stades précoces de la granulopoïèse. Ils induisent sa prolifération et l'engagent dans la différenciation. Le G-CSF et le M-CSF permettent à la différenciation d'aller à son terme, c'est-à-dire à produire des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Les cellules produisant ces différents facteurs de croissance permettent ainsi de réguler la granulopoïèse neutrophile.

### ➤ **Autres molécules :**

Certaines vitamines ou dérivés sont nécessaires au bon déroulement de la maturation granuleuse. De façon générale, la vitamine B12 et les folates sont indispensables à la maturation des différentes lignées hématopoïétiques (Koury *et al.*, 2004). La vitamine A et ses dérivés (acide rétinoïque) sont eux nécessaires au bon déroulement de la granulopoïèse neutrophile.



➤ **Régulation transcriptionnelle** :

L'action des facteurs de croissance aboutit à l'expression séquentielle de gènes spécifiques fortement régulés par des facteurs de transcription.

## ***II La greffe de cellules souches hématopoïétiques***

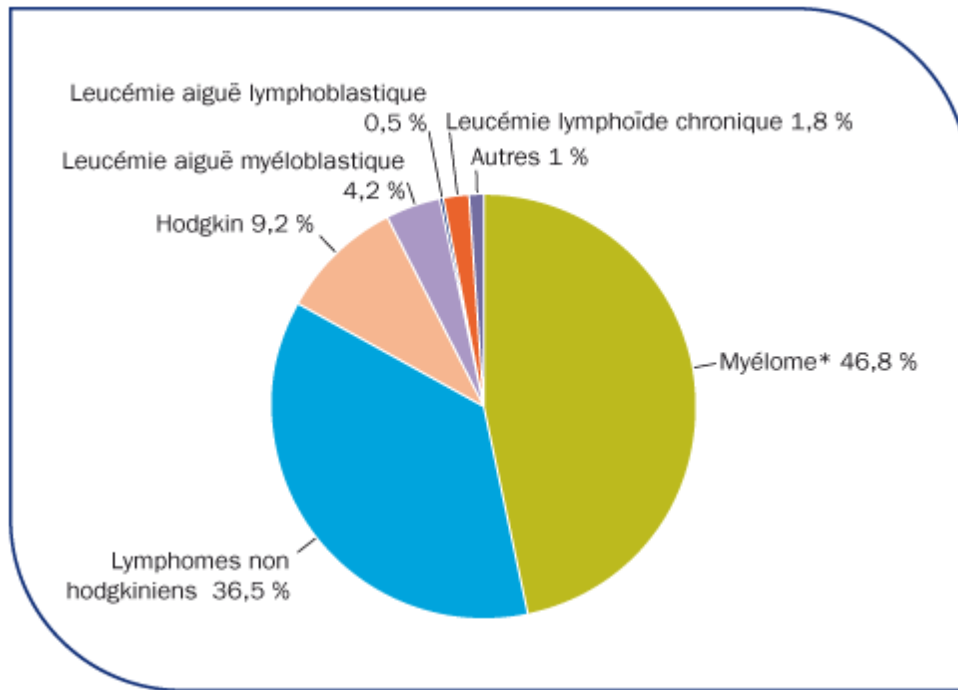
---

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) représente une alternative thérapeutique majeure dans le traitement de certaines hémopathies. En effet, la greffe de CSH est de plus en plus utilisée, et ceci dans de nombreuses situations. La greffe de CSH peut aussi être réalisée consécutivement à une transplantation d'organes. Le nombre de greffe de CSH réalisées en France est en augmentation.

### **A Les différents types de greffe de cellules souches hématopoïétiques**

➤ **L'autogreffe** : Dans ce type de greffe, les CSH sont recueillies chez le malade lui-même. Dans un premier temps, le greffon est prélevé chez le malade lors d'une phase de rémission de sa maladie, puis conservé avant d'être réinfusé au malade dans une période de consolidation de la maladie. L'avantage de l'autogreffe de CSH est l'absence de rejet, ou de maladie du greffon contre l'hôte (GVH) mais elle est utilisée comme support transfusionnel plutôt que véritable traitement.

L'autogreffe est destinée à des patients atteints de différentes formes d'hémopathies malignes ou de cancers solides résistants aux traitements (cancer du système nerveux, du sein, des ovaires, des os...). Les indications thérapeutiques des autogreffes de CSH réalisées en 2007 pour des hémopathies sont montrées sur la **figure 4**.

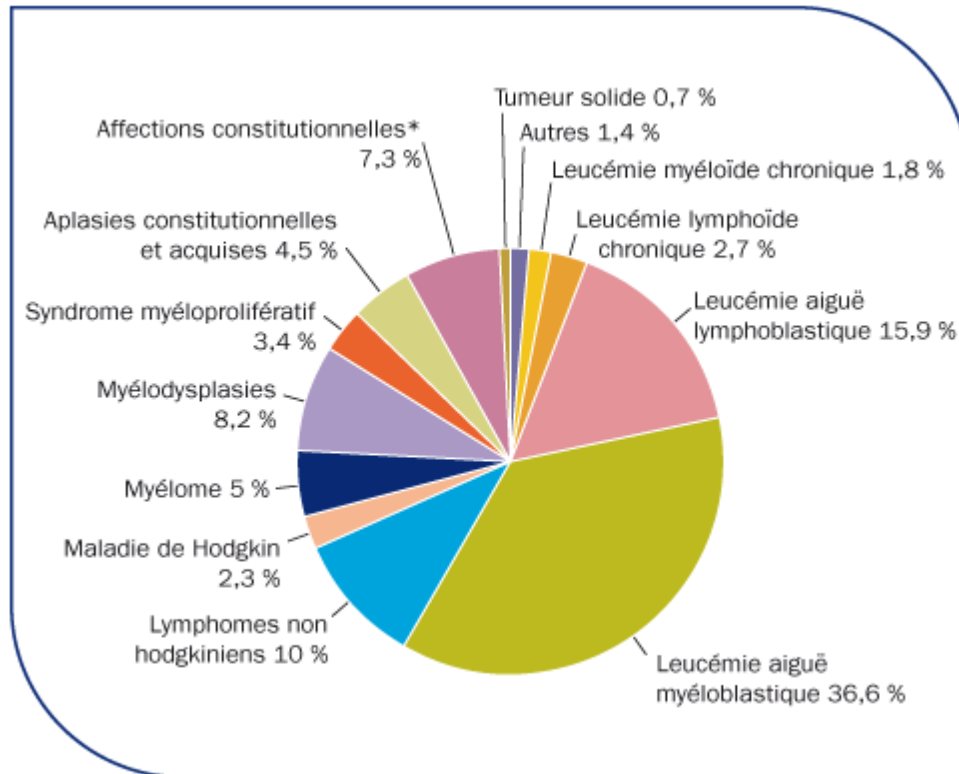


**Figure 4 : Répartition des diagnostics (hémopathies) chez les 2133 malades ayant reçu une autogreffe de CSH en 2007 et pour lesquels le diagnostic est connu**

D'après les données de l'agence de biomédecine pour le bilan d'activité 2007 ([http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport\\_2007/cellules/synthese/2\\_1\\_tabetfig.htm](http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport_2007/cellules/synthese/2_1_tabetfig.htm))

➤ **L'allogreffe** : Les CSH sont prélevées chez un donneur sain qui doit être HLA compatible avec malade ; dans ce cas, la greffe constitue une véritable immunothérapie contre la maladie résiduelle. Son principe est de détruire le compartiment cellulaire malin par le conditionnement et de le remplacer par des cellules saines et par l'effet immunologique des lymphocytes du donneur. De nombreuses complications dont le rejet et la GVH peuvent apparaître.

Les leucémies représentent la principale indication de l'allogreffe, ensuite, nous retrouvons les lymphomes et myélomes, les tumeurs solides, les maladies héréditaires (affections constitutionnelles, aplasie constitutionnelles) (**figure 5**)...



**Figure 5 : Répartition des indications thérapeutiques des allogreffes de CSH en 2007**

D'après l'agence de biomédecine pour le bilan d'activité 2007 ([http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport\\_2007/cellules/synthese/2\\_1\\_tabetfig.htm](http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport_2007/cellules/synthese/2_1_tabetfig.htm))

## **B Les sources de cellules souches hématopoïétiques des greffons allogéniques**

Trois sources de CSH sont aujourd'hui utilisées en France, la moelle osseuse, les CSP et le sang placentaire (Le Berre, 2005). Chaque type de greffon possède ses avantages et ses inconvénients, et depuis 1998, le pourcentage de greffons de moelle osseuse utilisés diminue alors que ceux des greffons de CSP et de sang placentaire augmentent (**figure 6**).

### ***1 La moelle osseuse***

La première greffe de moelle osseuse a été effectuée en 1957 (Thomas *et al.*, 1957), et jusqu'en 1990, elle était la seule source de CSH utilisable.

La moelle osseuse est prélevée par ponction au niveau du bassin du donneur sain. Ceci nécessite une anesthésie générale de 2 heures et une hospitalisation de 48 heures. La moelle est la seule source de CSH prélevable autorisée chez un donneur mineur.

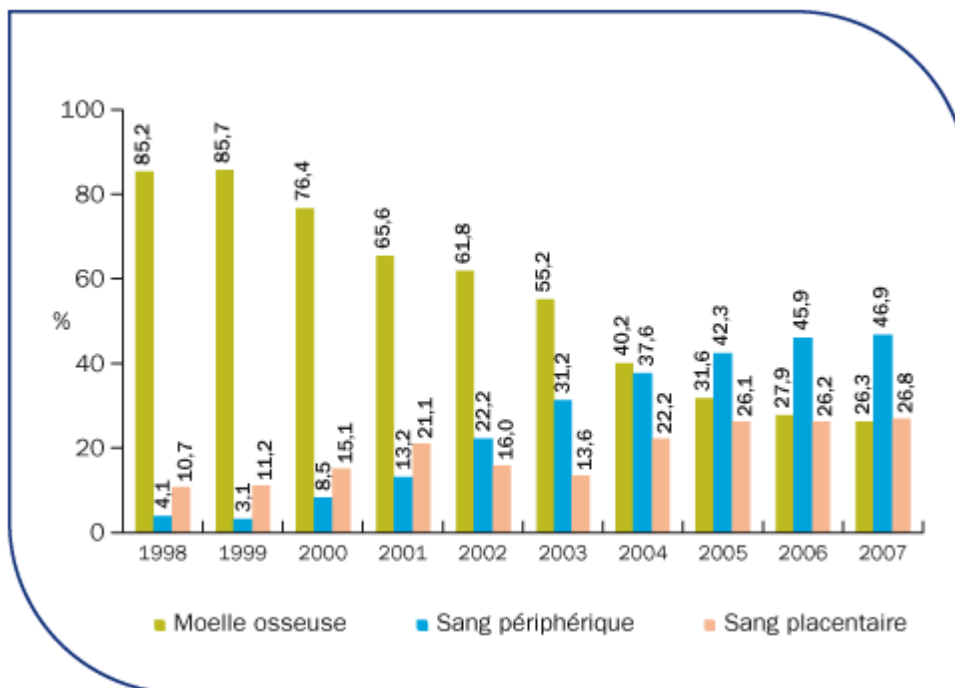
## ***2 Les cellules souches périphériques mobilisées par un facteur de croissance***

Dès 1979, une seconde source de CSH a été explorée, mais la mobilisation des CSH par un facteur de croissance, le G-CSF, vers le sang périphérique était difficile à mettre au point. La première greffe de CSP mobilisées par un facteur de croissance n'a été possible qu'en 1995. Le donneur doit ainsi subir plusieurs injections de facteurs de croissance et le greffon est prélevé par cytophérèse sur un appareil de tri des cellules.

## ***3 Le sang placentaire***

En France, la première greffe de sang placentaire a été réalisée en 1988 par le Pr Eliane Gluckman (Gluckman *et al.*, 1989).

Le sang placentaire est une source très riche en CSH, son prélèvement est simple et ne nécessite aucune stimulation préalable. Les cellules du cordon ombilical ont des capacités de prolifération et d'expansion plus grande que celles de l'adulte et sont plus immatures ce qui permet de réaliser des allogreffes avec une compatibilité HLA non complète. Les CSH issues du sang placentaire ont d'abord été utilisées lors de greffes allogéniques pédiatriques, mais leur utilisation en greffe adulte est de plus en plus fréquente. En effet, la limitation due au faible volume d'une unité de sang placentaire (et donc au faible nombre de CSH présentes dans cette unité) peut être contournée par l'injection simultanée de plusieurs unités à un seul patient adulte. De ce fait, l'utilisation de sang placentaire subit une augmentation exponentielle depuis quelques années.



**Figure 6 : Evolution de la répartition des sources de greffon des CSH allogéniques non apparentées utilisées en France**

D'après l'agence de biomédecine pour le bilan d'activité 2007 ([http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport\\_2007/cellules/synthese/2\\_1\\_tabetfig.htm](http://www.agence-biomedecine.fr/fr/rapport_2007/cellules/synthese/2_1_tabetfig.htm)). La moelle osseuse est lentement remplacée par les CSP et le sang placentaire.

#### ***4 Choix de la source de CSH***

La source du greffon hématopoïétique utilisé a une influence considérable sur les résultats de la greffe. En effet, la cinétique de reconstitution immunologique et hématologique et la survenue de complications post-transplantation varient en fonction du type de greffon utilisé. Le choix du type de greffon est également basé sur les antécédents du patient, son âge, le diagnostic, l'évolution de la maladie, le nombre d'autogreffes déjà réalisées...

Pour les autogreffes, le critère principal de choix est la quantité de CSH CD34+. En effet, l'infusion d'un plus grand nombre de cellules CD34+ entraîne une reconstitution hématologique plus rapide. Les CSH obtenues dans le sang après mobilisation contenant plus de cellules CD34+ que les CSH prélevées dans la moelle osseuse, les CSP représentent la source majeure de greffons autologues.

Pour les allogreffes, la quantité de cellules CD34+ infusée semble aussi être un facteur essentiel à une bonne reconstitution hématologique, mais les autres sous populations cellulaires présentes dans le greffon jouent également un rôle capital dans la greffe. Les lymphocytes T du donneur sont capables d'induire la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), ainsi, les greffons de CSP sont associés à un risque plus élevé de GVH chronique que les greffons issus de moelle osseuse ou de sang placentaire.

## **C Les différents conditionnements du patient**

Avant la greffe, le receveur doit subir un conditionnement afin de supprimer son immunité et de prévenir le rejet du greffon. Le type de conditionnement administré au patient dépend essentiellement de son âge, de ses antécédents, du type de maladie, de son stade, des facteurs prédictifs de la maladie.

➤ **Le conditionnement myélo-ablatif** : Ce traitement est constitué par de fortes doses de chimiothérapie de type cyclophosphamide et par l'irradiation corporelle totale du patient à 12 Gray, induisant une diminution de la quantité de cellules tumorales et un contrôle antitumoral immunologique assuré par les cellules lymphocytaires T allogéniques appelé effet greffon versus leucémie (GVL). Ce conditionnement peut également être constitué d'une combinaison de chimiothérapies, plusieurs associations sont possibles. Des exemples non exhaustifs de conditionnement myélo-ablatifs utilisés en France sont répertoriés dans le **tableau 1**.

Les complications de ce conditionnement reposent sur les complications de l'aplasie.

**Tableau 1 : Exemple de conditionnements myélo-ablatifs utilisés en France**

<b>Conditionnements myéloablatifs</b>	<b>Dose totale</b>	<b>Dose journalière</b>
<b>Irradiation corporelle totale</b>	<b>12 Gray</b>	<b>12 Gray</b>
<b>Irradiation corporelle totale</b>	<b>12 Gray</b>	<b>3 à 4 Gray</b>
<b>ICT-Cy</b>		
Irradiation corporelle totale	12 Gray	3 à 4 Gray
Cyclophosphamide	100 mg/kg	50 mg/kg
<b>Cy-ATG</b>		
Cyclophosphamide	200 mg/kg	50 mg/kg
Globulines anti-thymocytaires	90 mg/kg	30 mg/kg
<b>Bu-Cy</b>		
Busulfan	16 mg/kg	4 mg/kg
Cyclophosphamide	200 mg/kg	50 mg/kg
<b>Bu-Cy</b>		
Busulfan	16 mg/kg	4 mg/kg
Cyclophosphamide	120 mg/kg	60 mg/kg
<b>Bu-Mel</b>		
Busulfan	16 mg/kg	4 mg/kg
Melphalan	140 mg/m <sup>2</sup>	140 mg/m <sup>2</sup>

➤ **Le conditionnement non myélo-ablatif ou atténué** : Ce traitement est constitué de produits immunosuppresseurs permettant une bonne prise de greffe et une réduction notable de toxicité chez une population dite à risque. Certains conditionnements sont composés d'immunosuppresseurs associés à une irradiation complète de faible intensité ; et d'autres sont composés uniquement d'immunosuppresseurs, en général en association. Quelques exemples non exhaustifs de conditionnements non myélo-ablatifs utilisés en France sont décrits dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Exemple de conditionnements non myélo-ablatifs utilisés en France

Conditionnements non myéloablatifs	Dose totale	Dose journalière
<b>ICT-MMF-CSA</b>		
irradiation corporelle totale	2 Gray	2 Gray
MMF (mycophénolate mofétil)	840 mg/kg	30 mg/kg
CSA (cyclosporine A)	231,25 mg/kg	6,25 mg/kg
<b>ICT-Fludarabine</b>		
irradiation corporelle totale	2 Gray	2 Gray
fludarabine	90 mg/m <sup>2</sup>	30 mg/m <sup>2</sup>
<b>ICT-cyclophosphamide</b>		
irradiation corporelle totale	5,5 Gray	5,5 Gray
cyclophosphamide	120 mg/kg	120 mg/kg
<b>fludarabine-melphalan</b>		
fludarabine	150 mg/m <sup>2</sup>	30 m/m <sup>2</sup>
melphalan	140 mg/m <sup>2</sup>	140 mg/m <sup>2</sup>
<b>fludarabine-busulfan</b>		
fludarabine	180 mg/m <sup>2</sup>	30 mg/m <sup>2</sup>
busulphan	8 mg/kg	4 mg/kg
globulines anti-lymphocytaires	40 mg/kg	10 mg/kg
<b>fludarabine-cyclophosphamide</b>		
fludarabine	125 mg/m <sup>2</sup>	25 mg/m <sup>2</sup>
cyclophosphamide	120 mg/kg	60 mg/kg

L'utilisation de ces types conditionnements est relativement récente et permet d'élargir les indications des allogreffes aux patients âgés ou avec co-morbidité qui ne peuvent pas subir un conditionnement myélo-ablatif.

Après le conditionnement, le greffon prélevé chez un donneur est administré, par voie veineuse au receveur.

## **D L'alloréactivité des cellules hématopoïétiques**

Lors d'une réponse immunitaire "normale", les TCR des lymphocytes T d'un individu sont capables de reconnaître des peptides antigéniques présentés par une molécule CMH présentes à la surface des CPA du même individu. Ceci est dû à la restriction du CMH (Zinkernagel *et al.*, 1974). L'alloréactivité est la réaction immunitaire qui se développe lorsqu'un organe est greffé à un individu dont le CMH diffère de celui du greffon. En effet, malgré la restriction par le CMH, certains TCR sont capables de réagir avec des molécules du CMH allogénique. Le degré d'alloréactivité dépend du degré de disparité immunogénétique entre donneur et receveur : antigènes majeurs (HLA) et antigènes mineurs d'histocompatibilité. Dans le cas



d'une greffe hématopoïétique, le système immunitaire du receveur entre en conflit avec le système immunitaire du donneur. En effet, les antigènes du donneur peuvent être présentés au système immunitaire du receveur, et inversement.

Dans un contexte de greffe de CSH, l'alloréactivité des lymphocytes T (du donneur et du receveur) peut se traduire par la survenue d'une réaction de l'hôte contre de greffon (HVG ou rejet de greffe) ou au contraire d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH). La survenue d'une GVH est cependant beaucoup plus fréquente qu'un rejet de greffe.

D'autre part, l'alloréactivité des lymphocytes T peut avoir des conséquences bénéfiques. En effet, les lymphocytes T, B, NK et les cellules dendritiques présents dans le greffon vont assurer la protection du receveur (immunodéprimé par le conditionnement pré-greffe) des infections virales et opportunistes. D'autre part, les cellules T matures du donneur jouent un rôle antitumoral en détruisant les cellules tumorales résiduelles : effet du greffon contre la leucémie (GVL). Cet effet GVL est principalement dû aux cellules T alloréactives qui reconnaissent les cellules tumorales comme étant allogéniques.

L'alloréactivité est donc un phénomène qu'il faut réussir à maîtriser afin de trouver un équilibre entre les différents effets néfastes et bénéfiques (GVH, HVG et GVL) qu'elle entraîne.

### ***1 L'effet Greffon contre Leucémie (GVL)***

L'idée que le greffon puisse contribuer à l'effet anti-leucémique a été proposée dès 1956 par Barnes à partir d'un modèle murin (Barnes *et al.*, 1957). Depuis, plusieurs études expérimentales argumentent l'existence d'un effet anti-leucémique des lymphocytes T issus du greffon :

- Le pourcentage de récurrence leucémique est plus important chez les receveurs de greffe syngénique que chez les receveurs de greffe allogénique.
- Les greffes hématopoïétiques déplétées *ex vivo* en lymphocytes T sont associées à un pourcentage de rechute leucémique plus élevé que lors de greffes non déplétées.
- La probabilité de rechute est plus faible chez les patients qui développent une GVH (aigüe ou chronique) que chez les patients qui n'en déclarent pas.

➤ L'infusion de lymphocytes T du donneur (DLI) à distance de la greffe s'avère un traitement efficace de rechute d'hémopathies.

Les lymphocytes T présents dans le greffon jouent ainsi un rôle important dans la destruction des cellules tumorales persistantes ou émergentes. Ceci est possible grâce à la présence de certaines cellules immunocompétentes au sein du greffon, l'incapacité pour l'hôte de rejeter les cellules injectées et une disparité génique entre donneur et receveur. Les cellules immunitaires impliquées dans la GVL sont les lymphocytes T CD4+, CD8+ et les cellules NK contenus dans le greffon. De façon générale, les mécanismes d'action de la GVL sont mal connus. Les cellules NK pourraient médier l'effet GVL tout en prévenant la survenue de GVH.

## ***2 L'effet Hôte contre Greffon (HVG)***

L'effet HVG ou rejet de greffe est fréquemment associé à une mortalité élevée, il peut être caractérisé par une absence de reprise de fonction médullaire ou une absence de détection de cellules du donneur dans le sang du receveur. De nombreux facteurs comme, la nature du conditionnement pré-greffe, les caractéristiques du greffon administré, le degré d'incompatibilité HLA donneur-receveur ou la survenue d'infections virales, sont des variables déterminantes dans la prise de greffe.

Deux facteurs essentiels influencent la prise de greffe :

➤ La notion de « niche » dans le système lympho-hématopoïétique du receveur est le premier facteur. En effet, l'élimination préalable du système hématopoïétique du receveur semble indispensable à une prise optimale du greffon. Cette destruction pourrait créer un espace physique dans le microenvironnement médullaire et/ou induire la production de certaines cytokines.

➤ Le système immunitaire est le second facteur majeur pour une prise de greffe optimale. Les lymphocytes T du receveur participant au rejet du greffon, le conditionnement pré-greffe du receveur est essentiel. S'il s'avère insuffisant, les cellules persistantes du receveur seront capables de rejeter le greffon de CSH.

Une réponse humorale peut aussi être responsable du rejet du greffon. Des anticorps naturels peuvent exister chez une personne, par exemple, les anticorps dirigés contre les antigènes des

groupes sanguins ABO ou du système HLA. La présence d'anticorps dirigés contre le groupe sanguin du donneur ne présente pas une barrière majeure à la prise de greffe. En effet, l'incompatibilité au niveau des groupes sanguins est dite mineure dans les cas où les anticorps anti globules rouges du donneur peuvent reconnaître certains anticorps anti globules rouges du receveur (Lapierre *et al.*, 2000). En revanche, si le receveur possède des anticorps dirigés contre le système HLA du donneur, l'incidence sur le rejet de greffe est plus importante.

### ***3 La réaction du Greffon contre l'Hôte (GVH)***

La GVH est une complication sévère de la greffe de CSH. Elle est responsable d'une mortalité importante (10 à 50 %) et d'une morbidité considérable durant la première année post greffe. Les principaux facteurs de risque sont le degré d'incompatibilité HLA entre donneur et receveur, l'âge du receveur, le mismatch de sexe, la quantité de lymphocyte T dans le greffon, l'environnement infectieux et inflammatoire du receveur lors de la greffe et le traitement préventif de la GVH.

La GVH est due aux cellules matures immunocompétentes présentes dans le greffon qui reconnaissent les alloantigènes des tissus du receveur. Longtemps, la GVH a été considérée comme le résultat de l'action des lymphocytes T du donneur, mais on sait maintenant que d'autres cellules comme les cellules B, NK ou les cellules dendritiques du receveur jouent un rôle dans la survenue de la GVH.

La GVH est caractérisée par de nombreux syndromes clinico-pathologiques au niveau de la peau, du foie, du tractus gastro-intestinal, ainsi que par une perte de poids. Ces syndromes peuvent affecter un seul ou plusieurs de ces organes en même temps. Pour établir un diagnostic de GVH, les données cliniques ont besoin d'être appuyées par des examens biologiques.

Deux formes de GVH sont distinguées, chacune avec des cinétiques et des caractéristiques physiopathologiques différentes :

➤ **La GVH aigüe** : Théoriquement, elle survient précocement après la greffe (avant 100 jours post greffe) et se caractérise par une perte de poids, des atteintes cutanées, digestives, hépatiques et pulmonaires, et par une immunosuppression importante.

Le conditionnement du patient provoque, dans un premier temps, des dommages tissulaires conduisant à une activation des tissus sains, comme les muqueuses intestinales ou le foie qui vont synthétiser transitoirement des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , ainsi, « l'orage cytokinique » s'installe. Lors de cette « phase d'induction », ces cytokines vont augmenter l'immunogénicité des cellules présentatrices d'antigènes du receveur *via* l'augmentation du niveau d'expression des molécules de classe I et II et des molécules de costimulation favorisant, dans un second temps, l'activation des lymphocytes T matures alloréactifs du greffon. Après la « phase d'expansion » clonale des lymphocytes T alloréactifs, ils produisent des cytokines de type I telles que l'IL-2, le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  et des chimiokines (Ferrara *et al.*, 1996). Toutes ces molécules induisent la prolifération des lymphocytes T et leur différenciation en cellules effectrices, cytotoxiques ou auxiliaires, et secondairement, elles activent les cellules NK et les macrophages tissulaires, qui vont à leur tour synthétiser un grand nombre de cytokines pro-inflammatoire comme le TNF- $\alpha$  et l'oxyde nitrique induisant des lésions tissulaires spécifique de la GVH.

La destruction des tissus est ainsi produite par les cellules du donneur (lymphocytes alloréactifs, cellules NK et macrophages) mais également par les cellules du receveur (cellules NK et macrophages). Le rôle des différentes sous populations lymphocytaires T (CD4+ ou CD8+) est mal défini. Cependant, il a été montré dans un modèle murin que les CD4+ sont impliqués dans la survenue de GVH dans des modèles de greffe de CSH avec disparité des CMH de classe II alors qu'ils apparaîtraient comme protecteurs de la GVH dans un modèle de greffe de CSH avec incompatibilité de classe I, où les CD8+ seraient responsable de cette GVH (Sprent *et al.*, 1990).

➤ **La GVH chronique** : Théoriquement, elle survient plus tardivement, plus de 100 jours après la greffe et, est en partie liée à une GVH aigüe préalable. La GVH chronique dépend de la présence des lymphocytes T du donneur qui ne deviennent pas tolérants envers les tissus du receveur (Rozendaal *et al.*, 1990). Tout comme la GVH aigüe, elle présente des atteintes cutanées, hépatiques et intestinales. De plus, elle peut toucher d'autres organes tels que les poumons, les reins, les glandes salivaires et lacrymales.

La GVH chronique se présente comme un syndrome auto-immun étant en partie lié à l'activation des lymphocytes B du receveur par les lymphocytes T du donneur *via* les molécules du CMH. Ceci induit, dans un premier temps, la production d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN, les muscles lisses, le récepteur à l'acétylcholine ou certains organites

comme la mitochondrie ou les nucléoles (Chen *et al.*, 1998) et dans un second temps, l'activation des lymphocytes T du receveur (Parkman, 1998).

#### ***4 Complications infectieuses***

Après la greffe de CSH, une période, limitée dans le temps (avant l'émergence des cellules NK, TCD8 et TCD4 post greffe), d'aplasie médullaire favorise le développement d'infections opportunistes. A ce stade, le patient immunodéprimé peut présenter des complications fongiques (*Candida*, *Aspergillus...*), parasitaires (*Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii...*), virales (*Epstein-Barr virus*, *cytomégalo virus*, *adenovirus...*) et bactériennes. Une sortie rapide d'aplasie du patient classiquement caractérisée par le nombre de polynucléaires neutrophiles est essentielle pour combattre les infections bactériennes et fongiques. Les lymphocytes T du greffon ont eux un rôle dans la lutte contre les infections virales. L'implication des lymphocytes T dans la lutte contre la survenue de telles infections est démontrée par le développement de lympho-proliférations induites par l'EBV suite à une greffe T-déplétée.

### **E La reconstitution hématopoïétique et immunologique**

La reconstitution immunitaire est d'une importance capitale pour l'induction de tolérance à l'encontre des antigènes allogéniques. Cette reconstitution est cruciale pour la reprogrammation du système immunitaire mais aussi pour la capacité des patients à répondre à des agressions virales post transplantation. La présence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène est cependant requise pour la protection à l'encontre des infections virales et fongiques mais aussi pour l'induction de réponses humorales optimales.

De nombreux facteurs tels que l'âge du receveur, la source du greffon, la composition cellulaire du greffon, le degré d'incompatibilité du système HLA, le conditionnement du patient, le traitement anti infectieux ou immunosuppresseur reçu par le patient ou la survenue de complications post greffe peuvent influencer la reconstitution post greffe.

La période de neutropénie qui suit la greffe est une période propice au développement d'infections, la rapide reconstitution des granulocytes prévient ces infections. En effet, la

normalisation du nombre de granulocytes (macrophages, monocytes et polynucléaires neutrophiles) n'a lieu que 2 à 4 semaines après la greffe. La durée de la neutropénie est plus courte lors d'une greffe de CSP comparée à une greffe de moelle osseuse (Przepiorka *et al.*, 2001). De même, la reconstitution des cellules dendritiques est rapide et dépendante de la source du greffon, mais de façon générale, le nombre de cellules dendritiques d'origine monocytoïde revient à la normale avant celui des cellules dendritiques d'origine plasmacytoïde. Il a été montré que ces cellules dendritiques nouvellement produites dérivent du donneur (Fearnley *et al.*, 1999). Les numérations des cellules NK reviennent eux aussi à la normale très rapidement. Les cellules NK peuvent ainsi jouer leur rôle au niveau de l'immunité antivirale et prévenir la survenue d'infections.

Le nombre des cellules B circulantes reste faible pendant 2 à 3 mois après la greffe et leur capacité à synthétiser certaines immunoglobulines (tel que IgA) n'est restaurée que 1 à 2 ans après la greffe. Les cellules B sont fortement impliquées dans la survenue d'une GVH chronique et des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules B pourraient être une cible thérapeutique pour lutter contre la GVH chronique (Ratanatharathorn *et al.*, 2003).

La reconstitution des cellules T peut se faire par deux voies différentes. Elle peut provenir d'une expansion de cellules T *de novo* dans le thymus dérivée des cellules souches du donneur. Cependant, cette voie de production des cellules T est affectée lorsque l'âge des patients est élevé. La seconde voie permettant la reconstitution des cellules T est indépendante du thymus, il s'agit de l'expansion périphérique des cellules T présentes dans le greffon. La reconstitution des cellules T CD8<sup>+</sup> suppressives se fait précocement après la greffe (environ 3 mois), et le nombre des cellules T CD4<sup>+</sup> ne revient à la normale que plus tardivement. Ceci explique l'inversion du ratio CD4 / CD8, la diminution du pool de cellules naïves et la perte de la diversité du répertoire T.

Des études comparant la reconstitution immune post greffe de CSP ou de moelle osseuse ont cependant mis en évidence certaines différences. En effet, la reconstitution immune survenant après une greffe de CSP est caractérisée par une meilleure reconstitution myéloïde et lymphoïde (Talmadge *et al.*, 1997). Il a également été démontré que la reconstitution des cellules CD4<sup>+</sup> naïves est accélérée et soutenue après greffe de CSP.

### ***III La greffe de cellules souches périphériques***

---

Une alternative plus récente à la greffe de cellules souches médullaires est le développement de protocoles de greffe de CSP obtenues après mobilisation des CSH dans le sang par le G-CSF. La greffe de CSP possède l'avantage d'éviter une anesthésie et de multiples ponctions de moelle au donneur, et d'enrichir le greffon en cellules souches CD34+.

#### **A Structure et fonction du couple G-CSF / G-CSF-R**

Le facteur de stimulation des colonies granulocytaires (G-CSF = Granulocyte Colony Stimulating Factor), initialement nommé CSF-3 (Colony Stimulating Factor 3) est un facteur de croissance hématopoïétique. Son rôle principal est de stimuler la prolifération et la différenciation des progéniteurs de la lignée granulocytaire de la moelle osseuse, et d'induire la migration des polynucléaires neutrophiles dans le sang circulant.

##### ***1 Structure du G-CSF***

Le G-CSF est le produit d'un gène localisé sur le chromosome 17 en position 17q11.2-q12, au niveau du point de cassure de la translocation t (15 ; 17) retrouvée dans certaines leucémies. Le gène est composé de 4 introns et, par des mécanismes d'épissage alternatif de l'ARN messager, 2 transcrits peuvent être synthétisés (Nagata *et al.*, 1986). Les 2 transcrits sont traduits en 2 glycoprotéines fonctionnelles de 174 et 180 acides aminés, la protéine de 174 acides aminés est majoritairement synthétisée. Les protéines contiennent chacune 2 ponts disulfures et sont glycosylées niveau de la thréonine 133.

Le G-CSF est principalement produit par les monocytes, les macrophages mais peut également être sécrété par les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules du stroma médullaire. Sa production est induite par diverses cytokines comme TNF, IL-1, GM-CSF ou IL-17, mais elle peut également être inhibée par la lactoferrine ou la prostaglandine E.

## ***2 Les différents types de G-CSF***

En clinique, le G-CSF est utilisé sous forme d'une protéine recombinante synthétisée par génie génétique à partir de la protéine majoritaire de 174 acides aminés. Deux systèmes de synthèse sont possibles, un système procaryote et un système eucaryote.

### ***a Le filgrastim***

Le G-CSF filgrastim commercialisé par Amgen sous le nom de Neupogen® est une protéine non glycosylée d'un poids moléculaire de 18,8 daltons. Sa séquence est composée de 175 acides aminés correspondant à la séquence primaire du G-CSF additionnée d'une méthionine en position N-terminale. La protéine est produite par des bactéries *Escherichia Coli* dans lesquelles a été introduit le gène du G-CSF humain. La demi-vie du filgrastim est de 3 heures et demi.

### ***b Le lenograstim***

Le G-CSF lenograstim commercialisé par Chugai sous le nom de Granocyte® est une protéine glycosylée de 174 acides aminés. Sa séquence correspond exactement à la séquence primaire du G-CSF humain. Les cellules productrices du Granocyte® sont des cellules eucaryotes de lignée ovarienne de hamster chinois (CHO). La glycosylation de la molécule lui confère une plus grande stabilité, et sa demi-vie est de 3 à 4 heures.

Des études comparant l'efficacité des 2 types de G-CSF (filgrastim ou lenograstim) lors de la mobilisation des CSP ont été effectuées, leurs résultats sont controversés. Ings *et al* montrent que le nombre de globules blancs est plus élevé pour un donneur mobilisé par filgrastim que pour un donneur mobilisé par lenograstim. Au contraire, le nombre de cellules CD34+ obtenues suite à la mobilisation par lenograstim est plus élevé qu'à la suite d'une mobilisation par filgrastim. Fischer *et al* ont mis en évidence les mêmes résultats, mais en revanche, plusieurs autres équipes ne mettent en évidence aucune différence significative de la mobilisation due au type de G-CSF administré.



### *c Le peg-filgrastim*

Le G-CSF pégylé commercialisé par Amgen sous le nom de Neulasta® est composé d'une molécule de filgrastim de 18,8 kDa additionnée d'une molécule de polyéthylène glycol (PEG) de 20 kDa au niveau de la partie N-terminale du G-CSF. Le peg-filgrastim possède les mêmes propriétés physiologiques, les mêmes modes d'action que les G-CSF (filgrastim ou lénograstim), mais il a une demi-vie considérablement prolongée dans l'organisme. En effet, sa demi-vie varie de 15 à 80 heures, soit 5 à 25 fois plus que les molécules de G-CSF non pégylées.

A ce jour, le PEG-G-CSF n'est que très peu utilisé dans le cadre de la mobilisation de cellules souches. Certaines équipes l'utilisent pour mobiliser des enfants porteurs d'une tumeur maligne solide et ayant l'indication de prélèvement de CSH en vue d'une chimiothérapie intensive (Merlin, Kanold, Clermont Ferrand). Une seule injection d'une forte dose de PEG-G-CSF (300 µg/kg) améliorerait la qualité de la mobilisation des CSH chez l'enfant, tout en offrant une meilleure acceptabilité.

## **3 Récepteur du G-CSF**

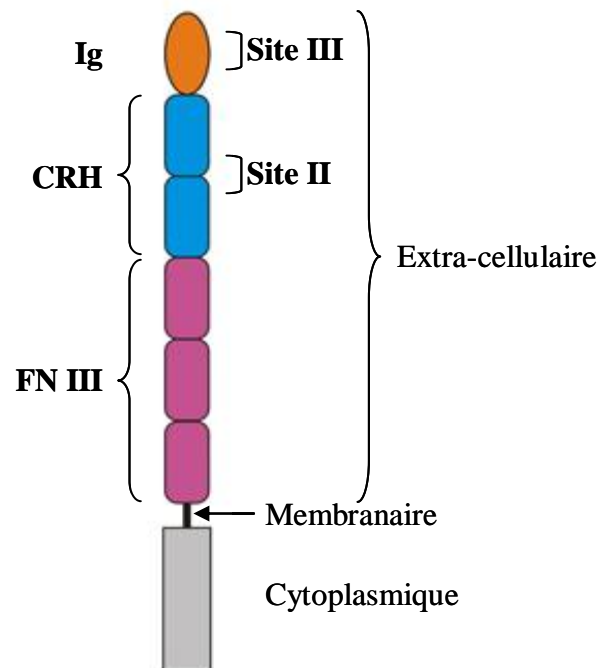
### *a Présentation du récepteur*

Le récepteur du G-CSF (G-CSF-R) est une protéine transmembranaire d'environ 150kDa appartenant à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques. Il est présent à la surface de nombreuses cellules notamment au niveau des cellules précurseurs de la moelle osseuse, mais il peut aussi être retrouvé au niveau des plaquettes, des cellules endothéliales ou du placenta. Chaque cellule possède de 50 à 500 récepteurs et ce nombre peut être augmenté avec le niveau de maturation des cellules.

Le récepteur possède une forte affinité pour son ligand et il est composé de 3 parties, une partie extracellulaire (liaison du G-CSF), une partie transmembranaire et une partie cytoplasmique (transduction du signal). La partie extracellulaire contient un domaine homologue aux immunoglobulines (domaine Ig), un domaine homologue aux récepteurs des cytokines (domaine CRH) et 3 domaines homologues à la fibronectine de type III (domaine

FN III). La région cytoplasmique contient 4 résidus tyrosine jouant un rôle important dans la transduction du signal.

Le G-CSF-R possède 2 sites de liaison pour son ligand. Le premier site se trouve dans le domaine homologue aux immunoglobulines (Ig), et il est nommé site III. Le second, nommé site II, est situé entre les 2 boîtes du domaine homologue aux récepteurs des cytokines (CRH) (Layton *et al.*, 2006) (**figure 7**).



**Figure 7 : Structure du récepteur au G-CSF**

Le récepteur au G-CSF (G-CSF-R) est constitué de 3 domaines : extra-cellulaire, membranaire et cytoplasmique. Le domaine extra-cellulaire est lui-même composé de différentes structures : un domaine homologue aux immunoglobulines (Ig), un domaine homologue aux récepteurs des cytokines (CRH) et 3 domaines homologues à la fibronectine de type III (F III). Lorsque le G-CSF se lie au G-CSF-R, il y a dimérisation, ainsi, les sites I et II représentent les sites de liaison du G-CSF après dimérisation. Schéma modifié d'après Layton J. et Hall N. *Frontiers in Bioscience*, 2006.

### ***b Mutations du récepteur***

Comme pour tous les récepteurs, la conservation de la structure et donc de la fonctionnalité du G-CSF-R est nécessaire.

Plusieurs études ont montré une corrélation entre une certaine mutation du récepteur et un risque accru de survenue d'un syndrome myélodysplasique. En effet, la mutation d'un seul nucléotide en position 785 entraîne le remplacement de l'acide aminé Glycine par l'acide

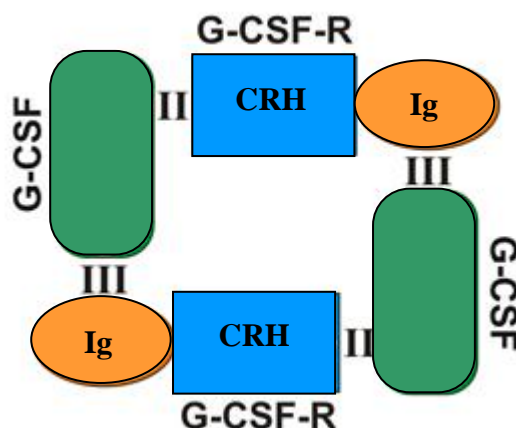
aminé Lysine au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Ceci provoque ainsi une modification de la cascade de signalisation et une prédisposition à la survenue d'un syndrome myélodysplasique. Cette mutation entraîne directement des risques de transformation leucémique chez un individu.

Une autre équipe a montré que certains patients atteints d'une neutropénie congénitale sévère possèdent une mutation au niveau du G-CSF-R. En effet, cette mutation est une mutation non sens entraînant le remplacement d'un codon par un codon stop et de ce fait, entraînant la formation d'un récepteur au G-CSF anormal et non fonctionnel (Dong *et al.*, 1994).

Une autre étude a été menée sur l'ubiquitination de la lysine 762 du récepteur. Ai *et al* ont montré que la poly-ubiquitination de cette lysine est indispensable au bon fonctionnement du récepteur (Ai *et al.*, 2008). Plusieurs mutations ou modifications post-traductionnelle du G-CSF-R peuvent donc être corrélées avec un récepteur non fonctionnel ou qui fonctionne mal. Une mutation pourrait également expliquer que pour certaines personnes, les traitements par G-CSF ne sont pas efficaces. Il en est de même pour les mobilisations des CSP qui échouent sans motifs apparents.

#### 4 La voie de signalisation G-CSF – G-CSF-R

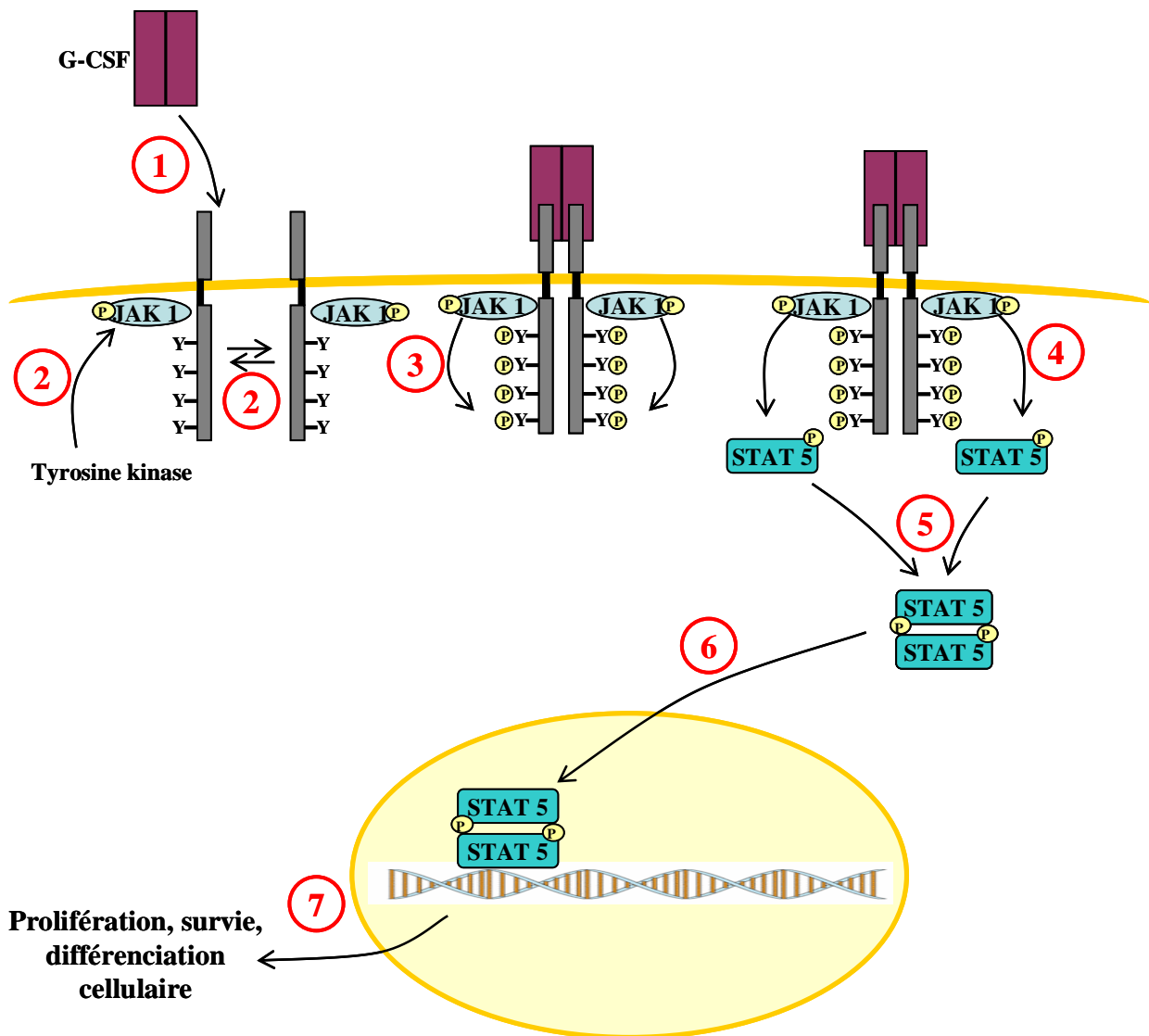
La voie de signalisation principale empreintée par le couple G-CSF / G-CSF-R est la voie de signalisation JAK 1 / STAT 5 (Avalos, 1996). La liaison du G-CSF à son récepteur provoque l'homodimérisation de G-CSF-R (**figure 8**).



**Figure 8 : Représentation schématique du complexe G-CSF / G-CSF-R**

Dans cette structure 2 : 2, 2 molécules de G-CSF interagissent avec 2 récepteurs. Un G-CSF se lie à la région CRH d'un récepteur *via* son site II et au domaine Ig du deuxième récepteur *via* son site III. Schéma modifié d'après Layton J. et Hall N. *Frontiers in Bioscience*, 2006.

Parallèlement, les JAK 1 kinases phosphorylées par des tyrosines kinases, se lient à la partie cytoplasmique du G-CSF-R, induisant la phosphorylation des 4 résidus tyrosines de son domaine cytoplasmique. Ceci provoque alors une cascade d'évènements et de phosphorylations mettant en jeu plusieurs molécules. La principale protéine activée par le G-CSF est la molécule STAT 5 permettant d'induire un signal de différenciation cellulaire (figure 9).



**Figure 9 : Voies de signalisation JAK 1 / STAT 5 mise en jeu par le couple G-CSF / G-CSF-R**

La voie de signalisation JAK 1 / STAT 5 est la principale voie de signalisation empreintée par le couple G-CSF / G-CSF-R. La première étape est la fixation d'un dimère de G-CSF à son récepteur ce qui provoque la dimérisation du G-CSF-R. La deuxième étape survenant en parallèle de la première est la phosphorylation par des tyrosines kinase des protéines JAK 1 qui se fixent alors à la partie intra-cellulaire du G-CSF-R. La cascade d'évènement commence alors : phosphorylation des tyrosines kinases du G-CSF-R, phosphorylation des protéines STAT 5 qui s'homodimérisent et vont alors agir au niveau de différents gènes entraînant prolifération, survie et différenciation cellulaire.

La liaison G-CSF – G-CSF-R peut aussi entraîner l'activation d'autres voies de signalisation telles que la voie de signalisation RAS/MAPK ou la voie de signalisation PI3-kinase.

- La voie de signalisation RAS/MAPK : cette voie peut mettre en jeu de différentes MAPK telles que les protéines ERK (Extracellular signal-Related Kinases), les p38, les JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase). Ces MAPK sont activées par la phosphorylation d'une thréonine et d'une tyrosine, elles phosphorylent elles-mêmes d'autres protéines impliquées dans les processus de réplication de l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire.
- La voie de signalisation PI3-kinase : Les PI3 kinases (PI3K) appartiennent à une famille d'enzymes qui phosphorylent les lipides inositols des membranes. Ces protéines peuvent s'associer à des tyrosines phosphorylées portées soit par un récepteur soit par une tyrosine kinase non récepteur. Puis, *via* son activité lipide kinase, la PI3K entraîne la phosphorylation spécifique de certains substrats. Les lipides membranaires phosphorylés vont alors servir de point d'ancrage à deux protéines kinase (PDK1 et Akt) qui sont impliquée dans l'inhibition de l'apoptose.

## ***5 Indications thérapeutiques***

Les indications thérapeutiques du G-CSF sont :

Réduction de la durée des neutropénies chez les patients (avec néoplasie non myéloïde) recevant une thérapie myélosuppressive suivie de greffe de moelle et présentant un risque accru de neutropénies sévères et prolongées.

Réduction de la durée des neutropénies sévères et des complications associées chez les patients au cours des chimiothérapies établies, connues pour être associées à une incidence significative de neutropénies fébriles.

Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique.

Traitement de certaines neutropénies congénitales

## ***6 Contre-indications du G-CSF***

Les contre-indications du G-CSF sont :

Hypersensibilité connue au G-CSF ou à l'un des composants

Association avec d'autres thérapies :

Le G-CSF ne doit pas être utilisé dans le but d'augmenter l'intensité de la dose de chimiothérapie cytotoxique

Le G-CSF ne doit pas être utilisé en même temps qu'une chimiothérapie cytotoxique

Patient souffrant de néoplasie myéloïde

## ***7 Effets secondaires***

### Hématologiques :

Risque de thromboses

Risque rare d'infiltrats pulmonaires

Risque d'activation de cellules tumorales

Risque d'anémies, de thrombopénies

Augmentation de la taille de la rate, avec retour à la taille initiale en moyenne 10 jours après la mobilisation

### Non hématologiques :

Douleurs osseuses : effet le plus couramment constaté

Migraine

Elévation des LDH

Allergies

Plusieurs études décrivent des cas isolés d'effets secondaires plus sérieux. En effet, 4 cas de rupture splénique spontanée suite à une mobilisation par G-CSF chez le donneur sain ont été rapportés. Dans certains cas, la mobilisation peut induire des événements auto-immuns, et un donneur a développé une hyperthyroïdie auto-immune sévère suite au traitement. D'autre part, 3 cas de leucémie aiguë se sont déclarés après une mobilisation chez des donneurs sains, mais statistiquement le lien direct n'a pas été établi.

## **8 Utilisations du G-CSF**

### ***a Mobilisation des cellules souches périphériques par G-CSF***

La mobilisation des CSP par le G-CSF est un procédé imitant l'augmentation physiologique du nombre de cellules souches dans la moelle osseuse en réponse à un signal de stress lors d'une blessure ou d'une situation d'inflammation.

Le G-CSF est généralement administré à la dose de 10 µg/kg (en une ou deux injections) durant 4 à 5 jours afin d'obtenir la dose minimale de  $4 * 10^6$  cellules CD34+ /kg de receveur. L'augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles a lieu de façon dose-dépendante 24 heures après le début de l'administration.

Le G-CSF, en se liant à son récepteur, provoque une augmentation considérable (10 à 15 fois) du nombre de cellules souches CD34 positives produites dans la moelle osseuse. Ces cellules nouvellement produites doivent alors passer dans la circulation sanguine. L'adhérence des CSH au microenvironnement médullaire est diminuée, la matrice extracellulaire est dégradée et les CSH peuvent ainsi passer à travers la membrane endothéliale pour gagner la circulation sanguine. Le mécanisme est mal connu, mais met en jeu de nombreuses molécules telles que des intégrines, des protéases ou des chemokines. En effet, nous savons que l'IL-8 et le couple CXCR4 / SDF1 jouent des rôles importants. Il a été montré que l'IL-8 entraîne une augmentation rapide des CSH circulantes chez l'animal (Pelus *et al.*, 2004). D'autre part, l'interaction CXCR4 / SDF1 permet aux CSH de rester dans la moelle osseuse et par conséquent, la rupture de cette interaction provoque une augmentation rapide des CSH circulantes. C'est pour cette raison que les antagonistes de CXCR4 comme AMD3100 (vendu sous le nom de Mozobil®) peuvent être utilisés pour mobiliser les CSH. Bien entendu, ces molécules ne fonctionnent pas seules, beaucoup d'autres sont nécessaires et certaines interactions permettant le homing des CSH doivent être rompues.

Il a été démontré que certains facteurs comme l'âge, le protocole de mobilisation ou la présence d'un allèle muté dans le gène codant pour SDF-1 peuvent influencer la mobilisation.

### ***b Traitement par G-CSF***

Le G-CSF peut être prescrit dans certains traitements d'épisodes fébriles chez les patients neutropéniques traités par chimiothérapie antitumorale. Le G-CSF permet de traiter les neutropénies d'une part en stimulant la production des neutrophiles et en activant leurs fonctions anti microbiennes, et d'autre part en retardant le passage en apoptose des neutrophiles produits.

Des données obtenues sur des polynucléaires neutrophiles humains montrent que le G-CSF administré en même temps que des antibiotiques concourent à un effet bactéricide synergique. Ces résultats encouragent l'utilisation du G-CSF associé à une antibiothérapie au cours d'infections aiguës non neutropéniques.

## **B Impact de la mobilisation par G-CSF sur le donneur sain**

A ce jour, les seuls effets secondaires généralement observés lors de la mobilisation sont une réaction allergique au produit (Keung *et al.*, 1999) de fréquence rare et, plus couramment des douleurs osseuses facilement contrôlées par l'administration d'antalgiques.

En revanche, au niveau immunitaire, la mobilisation par G-CSF entraîne plusieurs effets secondaires qui peuvent s'avérer plus ou moins conséquents pour le donneur.

### ***1 La numération des cellules sanguines***

Plusieurs études sur la mobilisation des CSP par G-CSF ont été réalisées, cependant, peu d'entre elles s'intéressent à l'effet à long terme du G-CSF.

De façon générale, toutes les études s'accordent à dire que la numération des cellules sanguines (leucocytaires, lymphocytaires, monocytaires, plaquettaires, érythrocytaires...) et celle des sous populations lymphocytaires sont augmentées au moment de la mobilisation et diminuées un mois après le prélèvement de CSP (Weaver *et al.*, 1994; Sica *et al.*, 1996; Ordemann *et al.*, 1998; Hartung *et al.*, 1999; Tayebi *et al.*, 2001; Heldal *et al.*, 2002). En



revanche, les résultats sont discordants en ce qui concerne la durée de ces modifications. Ordemann *et al* (Ordemann et al., 1998) et Heldal *et al* (Heldal et al., 2002) montrent que les numérations sont revenues à la normale 6 à 12 mois après le don de CSP, alors que Storek *et al* (Storek *et al.*, 2000) montrent une persistance d'anormalités au niveau des numérations monocytaires un an après le don. De même, une étude portant sur plus de donneurs (1125) a montré que les numérations des cellules nucléées totales, des neutrophiles et des lymphocytes ne sont toujours pas revenues à la normale un an après le prélèvement, ceci pourrait aussi être dépendant du nombre de cytophères. En ce qui concerne les sous populations lymphocytaires, il a été constaté que le nombre de lymphocytes T et B est également augmenté, contrairement au nombre de cellules NK (Tayebi et al., 2001). Cependant, l'effet du G-CSF sur les numérations des cellules B et NK est controversé, certaines équipes démontrent une augmentation de leur nombre (Sica et al., 1996; Hartung et al., 1999), et d'autres non, avec même une éventuelle diminution (Weaver et al., 1994; Rondelli *et al.*, 1998). L'augmentation du nombre des lymphocytes T n'est pas seulement associée à une modification de la répartition des sous populations lymphocytaires T (Dreger *et al.*, 1994; Carayol *et al.*, 1997; Tayebi et al., 2001). La durée de ces altérations reste mal connue et à explorer.

Concernant le taux d'hémoglobine, Ordemann *et al* (Ordemann et al., 1998) trouvent qu'il est diminué mais restauré un mois après le don, Heldal *et al* (Heldal et al., 2002) et Stroncek *et al* (Stroncek *et al.*, 1997) montrent une normalisation à un an seulement post don.

## ***2 Risque de transformation leucémique***

La mobilisation par G-CSF provoque une accélération transitoire de l'hématopoïèse et une augmentation du nombre de divisions cellulaires au niveau des CSH. Ces dérèglements pourraient potentiellement avoir des conséquences importantes en termes de développement leucémique ou de « vieillissement » du système immunitaire et hématopoïétique.

L'utilisation au long court et l'excès de G-CSF, chez des donneurs n'ayant aucun besoin particulier de cette molécule pourrait entraîner une « overdose » de ce produit et provoquer des effets néfastes.

En effet, chez des patients ayant une neutropénie congénitale, il a été montré que le G-CSF peut conduire au développement de leucémies. Il est vrai que ces patients sont plus sujets à développer une leucémie du fait de leur maladie sous-jacente, mais l'équipe de Donadieu a montré un réel « effet G-CSF » sur ce développement. Les patients ayant reçu de plus fortes doses de G-CSF et sur une durée plus longue sont plus susceptibles de déclarer une leucémie que les autres (ayant la même maladie, au même stade...) (Donadieu *et al.*, 2005).

Ces résultats concernant les patients peuvent amener à se demander si les donneurs sains ne courent pas un risque de transformation leucémique en acceptant que leurs CSP soient mobilisées par G-CSF. Peu d'étude se sont intéressées à un éventuel risque de transformation leucémique chez ces donneurs. Deux études concernant le suivi à long terme des donneurs de CSP ont été publiées. Cavallaro *et al* ont étudié l'effet du G-CSF recombinant sur 101 donneurs avec un recul de 3.7 ans post don. Aucun cas de transformation leucémique n'a pu être corrélé directement au traitement par G-CSF (Cavallaro *et al.*, 2000). De même, Anderlini *et al* n'ont pas pu démontrer de lien entre la mobilisation et la survenue de cancer (Anderlini *et al.*, 2002). Hasenclever avait écrit antérieurement que pour étudier ce lien, il faudrait considérer plus de 2000 donneurs sur une durée de 10 ans et plus (Hasenclever *et al.*, 1996).

En revanche, Nagler *et al* ont montré, au niveau des lymphocytes de donneurs ayant reçu du G-CSF, des altérations des gènes p53 et AML1 similaires à celles observées chez des patients atteints d'hémopathies malignes. Néanmoins, ces altérations sont réversibles. Ils ont également montré un asynchronisme de répliation aboutissant à des cellules aneuploïdes pour le chromosome 17. Il est vrai que ces dernières altérations n'ont pas été directement liées avec une transformation leucémique, mais le suivi des donneurs n'est pas assez long pour établir une réelle corrélation (Nagler *et al.*, 2004).

Plusieurs études montrent des déclarations d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides chez des donneurs ayant reçu du G-CSF, mais aucun lien de cause à effet n'a été démontré. En effet, dans ces études, le pourcentage de survenue de tumeurs malignes est très faibles et comparables à une population témoin (de la Rubia *et al.*, 2008). Des études plus approfondies doivent être réalisées afin de mettre en évidence (ou pas) un lien entre transformation leucémique et G-CSF.

## **C Effets immunologiques de la mobilisation par G-CSF sur le receveur**

La GVH est responsable d'une mortalité et d'une morbidité importantes après allogreffe de CSP. La physiopathologie de la GVH est complexe. Elle fait intervenir de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les lymphocytes T (du receveur et du donneur), les cellules NK, les cellules présentatrices d'antigènes... Ces différentes cellules synthétisent des cytokines qui seront responsables de l'inflammation au niveau des différents organes touchés.

Les résultats obtenus ne semblent indiquer aucune différence significative en terme de survenue de GVH aigüe suite à une allogreffe de CSP par rapport à une greffe de moelle osseuse (Bensinger *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1996; Urbano-Ispizua *et al.*, 1997), alors que la quantité de cellules T est plus importante dans le greffon de CSP (Weaver *et al.*, 1994). Un greffon de CSP prélevé chez un individu traité par G-CSF posséderait des lymphocytes T moins alloréactifs qu'un greffon de moelle osseuse. Ceci pourrait être expliqué par l'hypothèse d'une modification du profil cytokinique vers une réponse Th2 provoquée par le G-CSF (Hartung *et al.*, 1995). Cette hypothèse a été vérifiée dans un modèle murin par l'équipe de Ferrara *et al.*, plusieurs études l'ont également démontré chez l'homme. L'administration de G-CSF chez l'homme s'accompagne d'une diminution de synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF) en réponse à différents stimuli, et une augmentation de production des facteurs anti-inflammatoires (Hartung, 1999). Une étude clinico-biologique réalisée par la SFGM-TC (SFGM-CSF 315) a également mis en évidence une diminution de la synthèse de l'IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  par les lymphocytes T (Tayebi *et al.*, 2001). Concernant la synthèse d'IL-4, les données sont controversées, certaines études ont montré une augmentation de cette synthèse (Sloand *et al.*, 2000).

Il a également été montré que la greffe de CSP est associée à un risque accru de GVH chronique (Majolino *et al.*, 1996; Storek *et al.*, 1997).

Un mois après allogreffe de CSP, les numérations sanguines des lymphocytes T sont significativement plus élevées qu'après allogreffe de moelle osseuse. Ces différences sont également significatives pour les cellules CD4, CD8, CD45RA, CD45RO (Tayebi *et al.*,

2001). De façon générale, la reconstitution immune après allogreffe de CSP est meilleure 30 jours post greffe qu'après allogreffe de moelle osseuse.

## **D Caractérisation quantitative et qualitative du greffon de CSP**

Globalement, les greffons de CSP et les greffons de moelle osseuse possèdent des différences qualitatives et quantitatives.

Un greffon de CSP mobilisé par G-CSF contient environ 3 fois plus de cellules CD34+, permet ainsi une meilleure reconstitution hématopoïétique.

La quantité de lymphocytes T présents dans le greffon de CSP est plus importante que dans un greffon médullaire. Il contient environ 10 fois plus de cellules CD3+ que les greffons médullaires (Dreger et al., 1994; Korbling *et al.*, 1995; Tayebi et al., 2001), ainsi les patients reçoivent plus de  $2 \times 10^8$  CD3+ / kg. Ceci favorise l'effet GVL et la prise de greffe, mais cette quantité importante de cellules T peut aussi favoriser la survenue de GVH.

Dans un greffon de CSP mobilisées par G-CSF, le nombre de cellules de plusieurs sous populations lymphocytaires est environ 10 fois plus élevé que dans les greffons de moelle osseuse ; les sous populations concernées par cette augmentation sont les lymphocytes CD3+ CD4+, CD3+ CD8+, CD3+ CD45RA+, CD3+ CD45RO+, CD3+ CD25+, CD3+ CD95+, CD3+ HLADR+. Cependant, le pourcentage des cellules T CD25+, CD95+ ou HLADR+ est significativement plus faible dans les greffons de CSP, suggérant que le niveau d'activation des cellules T est plus faible comparé au greffon médullaire (Dreger et al., 1994; Tayebi et al., 2001).

Il a été montré que la normalisation du ratio CD4 / CD8 est plus rapide après allogreffe de CSP qu'après allogreffe de moelle osseuse indiquant une accélération de la reconstitution hématopoïétique et immune (Ottinger *et al.*, 1996). Le ratio CD4 / CD8 est différent selon le type de greffon, il y a autant de cellules CD3+ CD4+ que de cellules CD3+ CD8+ dans les greffons médullaires alors qu'il y a 2 fois plus de cellules CD3+ CD4+ que de cellules CD3+ CD8+ dans un greffon de CSP.

La fréquence des cellules suppressives CD3+ CD4- CD8- et CD3+ CD8+ CD56+ est similaire dans les greffons de moelle osseuse ou de CSP. Mais le nombre de cellules T doubles négatives est 10 fois plus élevé dans les greffons de CSP (Dreger *et al.*, 1996; Tayebi *et al.*, 2001), de par l'augmentation du nombre CD3+ total. Ceci confirme la plus faible activation des cellules après mobilisation par G-CSF.

D'autre part, il a été montré que la mobilisation par G-CSF induit une polarisation des cytokines de type 1 vers un profil de type 2 en entraînant une augmentation de la production d'IL-4 et une inhibition de la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Gorgen *et al.*, 1992; Glass *et al.*, 1997; Zeng *et al.*, 1997). En effet, dans les greffons de CSP, le pourcentage de lymphocytes CD3+ IFN- $\gamma$ + au sein des cellules CD3+ est 2 fois plus faible que dans les greffons médullaires, mais le nombre absolu de ces cellules reste pourtant 4 fois plus élevé. Après mobilisation, les cellules CD3+ IFN- $\gamma$ + sont donc moins capables de synthétiser l'IFN- $\gamma$ . Ces résultats sont supportés par Arpinati *et al.*, qui démontrent une mobilisation des cellules dendritiques de type 2 favorisant ainsi la réponse immunitaire de type 2, à médiation humorale (Arpinati *et al.*, 2000).



# **OBJECTIFS DU TRAVAIL**





## ***I Rationnel du projet de recherche***

---

Les CSH provenant du sang après mobilisation par facteurs de croissance, tel que le facteur de croissance des granuleux (G-CSF), sont devenues une alternative à l'utilisation d'un greffon médullaire. Ces CSP sont de plus en plus utilisées, non seulement en situation autologue, mais également, depuis plusieurs années, en situation allogénique, notamment dans le contexte des allogreffes à conditionnement non myélo-ablatif. Toutefois, l'alloréactivité associée à ce type de greffe est encore à ce jour mal connue.

De nombreuses études, notamment l'étude SFGM CSF 315 à laquelle a participé notre laboratoire, ont montré de nombreux effets immunomodulateurs dus à la mobilisation par G-CSF au sein des greffons.

Les effets immunomodulateurs du G-CSF pourraient avoir des conséquences importantes pour le donneur. Les effets de la mobilisation des CSH par le G-CSF à court terme sur le compartiment lymphocytaire ont largement été étudiés ; en revanche, les conséquences à moyen et long terme de cette mobilisation sont peu documentées et mal connues.

Ces effets immunomodulateurs pourraient également avoir des conséquences importantes chez le receveur en déterminant par exemple :

- la cinétique de reconstitution immunitaire, notamment au niveau de l'expansion périphérique des cellules administrées,
- la sensibilité ou la résistance aux infections,
- l'alloréactivité des cellules T administrées qui peuvent jouer un rôle primordial dans la survenue de GVH aigüe ou chronique, dans l'effet GVL ou la prise de greffe,
- l'augmentation du nombre de syndromes auto-immuns via une stimulation du compartiment cellulaire B (Tayebi *et al.*, 2001).

Ces effets doivent être encore explorés aussi bien chez le donneur que chez le receveur.

## ***II Projet de recherche***

---

Nous avons étudié l'impact de la mobilisation des CSP par le G-CSF sur les donneurs sains. L'étude « Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisés par G-CSF » est réalisée de façon prospective au sein du laboratoire. L'objectif de cette étude est d'évaluer, à moyen et à long terme, la nature et surtout la durée des altérations fonctionnelles immunologiques et génétiques induites par le G-CSF sur des donneurs sains.

Nous avons également exploré la cinétique de la reconstitution immunitaire d'un groupe de patients ayant reçu une greffe de CSP après un conditionnement d'intensité réduite ou non myélo-ablatif. Cette étude est réalisée de façon rétrospective sur des prélèvements préalablement congelés. Pour cela, les données hématologiques des patients ont été récupérées, et ont été corrélées aux examens biologiques qui ont été réalisés sur plusieurs populations et sous populations lymphocytaires.

# **MATERIELS ET METHODES**

# ***I Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisés par G-CSF***

---

Le but de l'étude est d'étudier l'impact de la mobilisation des CSP par le G-CSF sur les donneurs sains. L'étude « Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisés par G-CSF » a l'objectif d'évaluer, à moyen et à long terme, la nature et la durée des altérations fonctionnelles immunologiques et génétiques induites par le G-CSF sur des donneurs sains.

Dans un premier temps, il a fallu mettre au point le déroulement et le protocole de l'étude afin de soumettre le dossier au CCPPRB (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale). L'avis favorable du CCPPRB a été obtenu en octobre 2004.

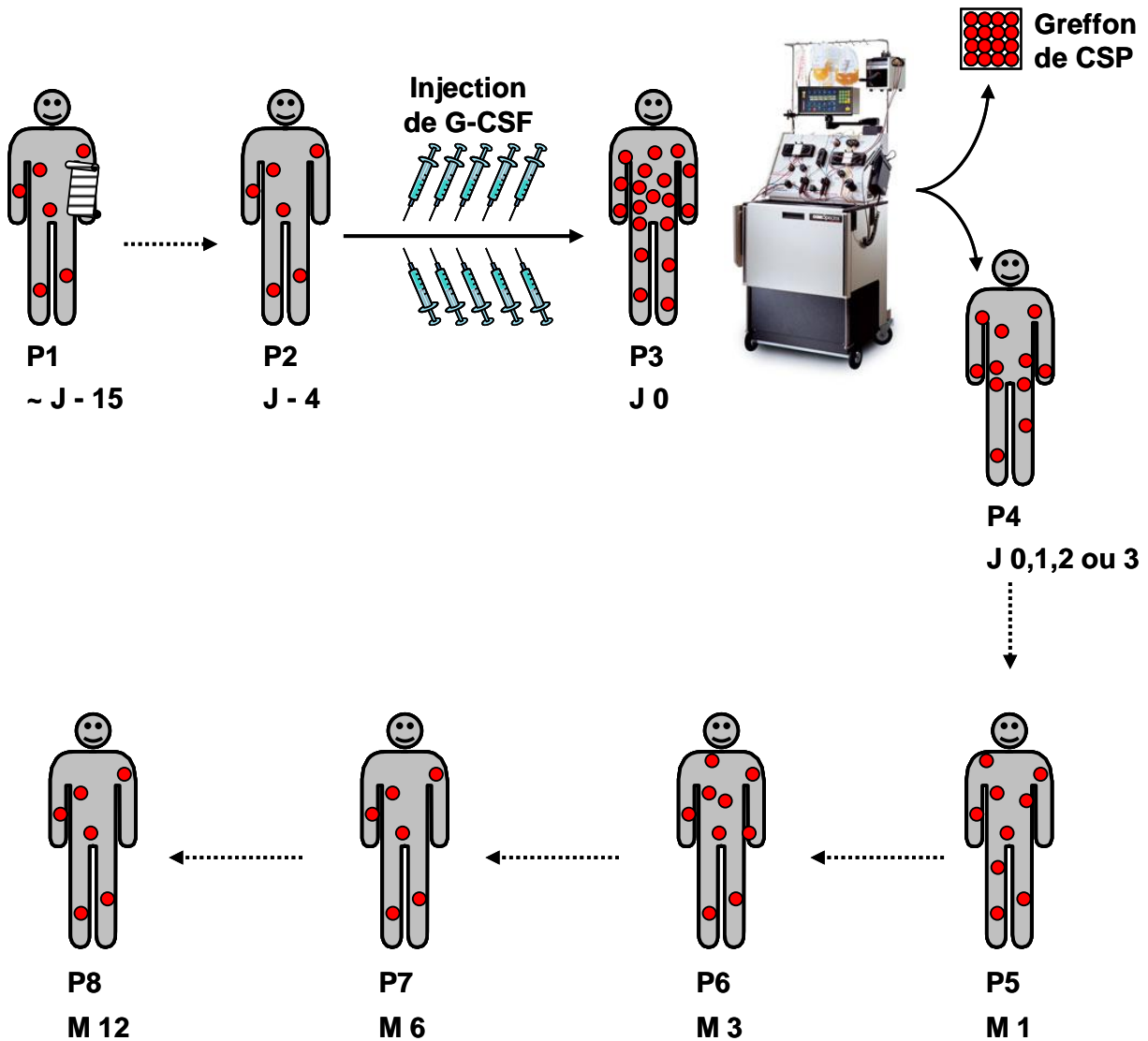
## **A Description de l'étude**

Au début de l'étude, les donneurs étaient exclusivement recrutés dans le service d'hématologie du CHU de Besançon. Toutefois, seulement 3 donneurs ont été inclus en 7 mois. Aussi, nous avons fait appel à d'autres centres greffeurs, et les équipes d'hématologie des CHU de Nancy et de Lyon ont répondu favorablement. Depuis janvier 2006, les donneurs sont recrutés dans les 3 centres.

Un donneur, s'il accepte d'être inclus dans l'étude, devra subir 8 prélèvements sanguins sur une période d'un an. Le déroulement de l'étude est résumé dans la **figure 10**.

Brièvement, lors d'une première visite auprès d'un médecin, les donneurs sont informés de l'étude. Lors d'une seconde visite, et si le donneur accepte de participer à l'étude, le consentement est recueilli et le premier prélèvement (P1) est réalisé. Le deuxième prélèvement (P2) sera réalisé par une infirmière à domicile avant la première injection de G-CSF. Ces 2 prélèvements (P1 et P2) serviront de témoins internes au donneur. En effet, ces 2 premiers prélèvements permettront d'évaluer la variabilité et la reproductibilité intra-individuelle des différentes analyses réalisées lors de l'étude. Nous pourrons ainsi utiliser la moyenne des résultats obtenus sur ces 2 prélèvements comme référence individuelle. Les troisième (P3) et quatrième (P4) prélèvements se feront avant et après le don de CSP (le P4

peut varier d'un jour ou deux selon le nombre de cytophérèse nécessaire), et les cinquième (P5), sixième (P6), septième (P7) et huitième (P8) prélèvements seront réalisés, à domicile, respectivement à 1, 3, 6 et 12 mois après le don de CSP.



**Figure 10 : Représentation schématique du déroulement de l'étude**

Lors d'une première visite, le donneur reçoit une lettre d'information sur l'étude et un consentement. S'il accepte d'y participer, il remet le consentement signé au médecin lors d'une seconde visite durant laquelle le premier prélèvement (P1) est réalisé. Le deuxième (P2) sera réalisé, à domicile, avant les injections de G-CSF. Les prélèvements 3 et 4 sont effectués avant et après le don de CSP (P4 dépend du nombre de cytophérèses nécessaires) et les prélèvements P5, P6, P7 et P8 sont réalisés à domicile respectivement 1, 3, 6 et 12 mois après la mobilisation.

## **B Les donneurs**

Les donneurs auxquels la participation à l'étude est proposée sont des donneurs qui ont d'ores et déjà accepté le don de CSP mobilisées par G-CSF. Les critères d'inclusion des donneurs sont les mêmes que ceux d'un don de CSP allogéniques, c'est-à-dire, être âgé de 18 ans minimum, être séronégatif pour le HIV, n'avoir aucune contre-indication au prélèvement de cellules périphériques par cytophèrese, n'avoir aucune allergie connue au G-CSF, et bien évidemment, avoir signé le consentement écrit.

Chaque donneur reçoit 2 injections de G-CSF glycosylé (Granocyte®, Lenograstim, Chugai Pharma, Paris, France) ou non-glycosylé (Neupogen®, Filgrastim, Amgen, Neuilly sur seine, France) 5 µg/kg par jour pendant 5 jours.

Les CSP sont ensuite collecté par cytophèrese (1 ou plusieurs) de façon à obtenir un nombre équivalent ou supérieur à  $4 \times 10^6$  cellules CD34+ /kg du receveur.

## **C Les échantillons biologiques**

Chaque prélèvement sanguin est constitué de 7 tubes. Six ml de sang sont prélevés sur EDTA pour réaliser les numérations sanguines et les extractions d'ARN et d'ADN. Six ml de sang sont prélevés dans un tube sec afin de récolter le sérum. Trente ml de sang sont prélevés sur héparine et centrifugés sur Ficoll afin d'obtenir les cellules mononucléées (CMN) du sang qui seront utilisées pour réaliser plusieurs analyses, et le surplus sera cryopréservé dans l'azote liquide.

## **D Numération des cellules sanguines**

Les numérations (leucocytaires, érythrocytaires, réticulocytaires, plaquettaires, monocytaires, lymphocytaires et celles des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et autres paramètres sanguins (taux d'hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, indice de répartition des hématies, volume plaquettaire moyen) sont mesurés par un automate XE 9100. Ces caractéristiques sont obtenues sur du sang anticoagulé prélevé sur EDTA. Ces numérations seront également

utilisées pour calculer les numérations des sous populations cellulaires en combinaison avec les résultats obtenus en cytométrie en flux.

## **E Analyse en cytométrie en flux des marquages membranaires**

Les fréquences des sous populations lymphocytaires sont obtenues par immunomarquages directs effectués sur les CMN. Les marquages réalisés et les anticorps utilisés (Becton Dickinson) sont listés dans le **tableau 3** ci dessous.

**Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux pour le phénotypage des cellules obtenues pour chaque prélèvement**

	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Per-CP</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC</b>
<b>Marquage 1</b>	45 RA	45 RO	3	19	4
<b>Marquage 2</b>	4	8	3	HLA-DR	95
<b>Marquage 3</b>	3	49b	4	25	18
<b>Marquage 4</b>	LIN	123	HLA-DR		11c

Les anticorps sont incubés avec  $5 * 10^5$  cellules 20 minutes à 4°C. Après lavage avec une solution de PBS supplémentée de 1% de SVF (v/v), les cellules sont fixées avec un tampon constitué de PBS et de formaldéhyde 2% (v/v) et analysées par cytométrie en flux avec un Cyan ADP (Dako-Cytomation) ou un Canto I (Becton Dickinson). L'analyse est réalisée sur un minimum de 10000 événements situés dans la région taille / structure correspondante aux lymphocytes. Le nombre absolu de lymphocytes appartenant aux différentes sous populations sont calculés en multipliant les fréquences obtenues en cytométrie en flux par le nombre absolu de lymphocytes préalablement obtenu par numération.

## **F Quantification de cytokines**

Un millions de cellules sont incubées dans un milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum humain et de PHA (10 µg/ml) pendant 24 et 72 heures (37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Au terme de la culture, les surnageants de culture sont cryopréservés à -80°C jusqu'à quantification.

Un kit de dosage lincoplex (Linco Research, USA) permet de quantifier 10 cytokines simultanément : IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ . Brièvement, les échantillons (25  $\mu$ l), les contrôles et les standards sont incubés avec les billes correspondantes aux différentes cytokines durant une heure. La quantification est ensuite révélée grâce à un système streptavidine-phycoérythrine. La plaque est alors analysée par un Luminex Athena Multi Lyte™ (Luminex Corporation) qui calcule directement les concentrations de chaque cytokines présentes dans le surnageant.

## **G Quantification des immunoglobulines**

Un millions de cellules sont incubées dans un milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de SVF et de Pokeweed Mitogen (1  $\mu$ g/ml) pendant 14 jours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Les surnageants de culture sont prélevés et conservés à -80°C jusqu'à la quantification des immunoglobulines. La technique d'ELISA est utilisée pour doser les immunoglobulines G et M séparément (kits Bethyl Laboratories, USA).

L'anticorps de capture est fixé au fond de chacun des puits avant leur saturation. Les standards, les contrôles et les échantillons sont incubés 1 heure et le dosage est ensuite révélé par un anticorps secondaire couplé à un système HRP (Horseradish Peroxidase). Les résultats sont alors obtenus par lecture des absorbances à 450nm.

## **H Analyses cytogénétiques : FISH**

### ***1 FISH : Fluorescent In Situ Hybridization***

#### ***a Préparation des échantillons***

Six cent cinquante  $\mu$ l de sang anticoagulé prélevé sur héparine (ou 300  $\mu$ l pour les prélèvements P3 et P4) sont mis en culture avec 6,75 ml de milieu RPMI 1640, 1,75 ml de SVF, 20  $\mu$ l d'une solution de pénicilline-streptomycine et 125  $\mu$ l de PHA (Oxoid) pendant 72 heures (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Au terme de la culture, le surnageant est éliminé par centrifugation (1000 rpm, 10 minutes) et le culot cellulaire est traité avec une solution hypotonique (37°C, 0,56 % KCl) et placé 20



minutes à 37°C. Après centrifugation (1000 rpm, 10 minutes), le culot est fixé avec une solution composée de 3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique glacial à température ambiante pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé (1000 rpm, 10 minutes) et le culot est repris dans 1 ml de solution de fixation. Le tube peut être stocké plusieurs mois à -20°C avant hybridation.

### ***b Hybridation***

Avant l'hybridation, les lames doivent être placées 2 minutes dans l'éthanol 100 %. Environ 200 µl de solution de fixation contenant les noyaux cellulaires sont étalés sur les lames. Dix µl d'un mix composé de 1 µl de chacune des 2 sondes marquées spécifiques des centromères des chromosomes 8 (spectre orange CEP 8 Z2 p11.1 – q11.1) et 17 (spectre vert CEP 17 Z1 p11.1 – q11.1), 7 µl de tampon et 1 µl d'eau sont déposés sur la lame et recouverts par une lamelle fixée par une gomme caoutchouc. Les sondes et l'ADN nucléaire sont co-dénaturés pendant 1 minute à 73°C et l'hybridation est réalisée à 37°C en atmosphère humide durant une nuit.

Après l'incubation, les lamelles sont retirées et les lames sont lavées successivement dans une solution 0,4 SSC (pH=6,8) à 73°C pendant 40 secondes et dans une solution 2 SSC, 0,05 % Tween 20 (pH=7) à température ambiante durant 10 secondes. Les lames sont séchées avant d'y ajouter le DAPI utilisé comme contre colorant et recouvertes d'une lamelle pour la lecture.

### ***c Lecture et analyse***

La lecture des lames est réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence Axiophot et des filtres d'excitation spécifiques des spectres orange, vert et du DAPI. Les images sont traitées avec le logiciel Cytovision.

Cinq cents noyaux sont examinés, chaque noyau présentant 1 (monosomie), 2, 3 (trisomie) ou plus (multisomie) signaux d'hybridation est recensé pour chacune des 2 sondes. Les fréquences des noyaux monosomiques, trisomiques ou multisomiques sont calculées et la somme de ces fréquences représente la fréquence des noyaux dits aneuploïdes.

## **2 Caryotype**

### ***a Préparation des échantillons***

Les échantillons sont mis en culture de la même façon que pour la réalisation de FISH. Au bout de 48 heures de culture, une première partie de la synchronisation des cellules est réalisée à l'aide de 200 µl de solution de synchronisation (22 ml de FrdU à  $10^{-5}$  M et 88 ml d'uridine à  $10^{-4}$  M). Les cultures sont replacées à 37°C. Sept heures avant la fin de la culture, la deuxième partie de la synchronisation est effectuée à l'aide de 160 µl de thymidine à  $10^{-3}$  M. Enfin, 3 heures avant la fin de culture, les cellules sont bloquées avec 0,2 ml d'une solution de vinblastine à 0,1 µg/ml.

Au terme de la culture, les cellules subissant un choc thermique de la même façon que pour les analyses de FISH.

### ***b Marquage des bandes G et R***

Les bandes G (bandes claires) sont obtenues par combinaison d'une digestion protéolytique avec une solution de trypsine et d'une coloration avec une solution de giemsa.

Les bandes R (bandes sombres) sont obtenues par combinaison d'une dénaturation thermique à 86°C et d'une coloration avec une solution de giemsa.

Grace à ces 2 colorations, les chromosomes sont identifiables.

### ***c Lecture des lames, classification des chromosomes***

Les chromosomes des noyaux métaphasiques peuvent alors être numérés et classés afin de mettre en évidence une anomalie du nombre de chromosomes.

## **I Analyses statistiques**

Pour chaque donneur, les valeurs des paramètres biologiques obtenues pour les prélèvements P1 et P2 sont supposées identiques. Cependant, un test t de Student est réalisé afin de le vérifier.

La moyenne des valeurs P1 et P2 ( $MOY_{P1,P2}$ ) est utilisée comme valeur de référence ou valeur normale. Pour chacun des donneurs, chaque valeur obtenue pour les prélèvements post G-CSF (P3 à P8) est comparée avec la moyenne de P1 - P2 à l'aide d'un test t de Student afin de déterminer les différences significatives.

Le coefficient de variabilité intra-individuel ( $(\text{écartype}_{P1,P2} / \text{racine } 2) / MOY_{P1,P2}$ ) est calculé pour les prélèvements pré G-CSF afin d'évaluer l'importance que l'on peut apporter aux variations observées pour les prélèvements post G-CSF. La moyenne des coefficients de variation de l'ensemble des donneurs est également calculée ( $MOY((\text{écartype}_{P1,P2} / \text{racine } 2) / MOY_{P1,P2})$ ).

Pour chaque prélèvement post mobilisation, la moyenne des variations est comparée à la moyenne des valeurs de référence afin de voir s'il existe une différence significative entre les résultats obtenus lors des prélèvements pré-G-CSF (dits de référence) et ceux obtenus lors du prélèvement post mobilisation. Ceci nous permet donc de voir si la mobilisation par G-CSF a des impacts sur les différents paramètres étudiés.

## ***II Etude de la reconstitution immunitaire après greffe de CSP***

---

Ce travail a majoritairement été réalisé par le Dr LAROSA, hématologue, lors d'un DEA, mais j'ai participé à ce travail par la réalisation de certaines analyses et manipulations complémentaires.

### **A Les patients**

Vingt patients ont été inclus dans cette étude, ils ont tous subi une greffe allogénique de CSP après un conditionnement d'intensité réduite ou non myélo-ablatif au CHU de Besançon entre novembre 1999 et mai 2003. Le conditionnement peut cependant être différent d'un patient à l'autre. Les données hématologiques des receveurs (diagnostic, statut de la maladie, conditionnement, complications post greffe...) sont résumées dans le tableau 2.

Tous les patients ont reçu une prophylaxie bactérienne (phénoxyméthylpénicilline 3MU/jour ou spiramycine 3 MU/jour), virale (valaciclovir 500 ng/2 fois par jour quand les couples étaient CMV- et 1 g/3 fois par jour quand le receveur et/ou le donneur était CMV+), et fongique (fluconazole 200 ng/2 fois par jour). Ils ont également été traités par pentamidine (1 fois par mois) ou cotrimoxazole (2 fois par jour) afin de prévenir *Pneumocystis carinii*. Chaque patient a reçu une prophylaxie de la GVH qui peut être différente, et 5 ont reçu un ou plusieurs infusions de lymphocytes du donneur (**tableau 4**).

## **B Les donneurs**

Les donneurs (18 donneurs intrafamiliaux et 2 donneurs volontaires) ont reçu 2 injections de G-CSF (5 µg/kg) par jour pendant 5 jours afin de mobiliser les CSH dans le sang périphérique. Les CSP (4 x 10<sup>6</sup> cellules CD34+ / kg du receveur) ont été collectées par cytophérèse le 5<sup>ème</sup> ± 6<sup>ème</sup> jour avec un système Spectra (COBE, Denver, USA).

**Tableau 4 : Caractéristiques des patients et de leurs donneurs**

Patient	Age D/R	Sexe D/R	CMV D/R	Diagnostic	Status de la maladie	Conditionnement	Prophylaxie GVH	Cellules CD34+ reçues (106/kg)	Cellules CD3+ reçues (106/kg)
1	50 / 54	M / M	- / -	LMMC	Progression	F-Ida-Ara-C	CSA-MTX	3	126,5
2	65 / 59	M / F	- / -	LMC	Progression	F-Bus-ATG	CSA-MTX		45,5
3	50 / 53	M / M	- / -	myélome	Progression	F-Bus-ATG	CSA	7,2	111,2
4	58 / 55	F / F	- / -	cancer du sein	Réponse partielle	F-Bus-ATG	CSA	11	129,9
5	66 / 65	F / M	+ / -	myélofibrose	Progression	F-Bus-ATG	CSA	5,1	63,7
6	45 / 57	F / M	- / +	LNH	Progression	F-TBI	CSA-MMF	7,4	351,7
7	59 / 50	F / M	+ / +	LMC	Progression	F-Cy-ATG	CSA-MMF	7,9	414,4
8	40 / 39	M / M	- / +	myélome	Réponse complète	F-Bus-ATG	CSA	6,9	77,1
9	51 / 60	F / F	+ / +	LA	Réponse complète	F-Bus-ATG	CSA	9,2	166,2
10	52 / 48	F / F	+ / -	carcinome renal	Réponse partielle	F-Bus-ATG	CSA		319
11	33 / 29	F / M	+ / -	LA	Réponse complète	F-TBI-ATG	CSA-MMF	9,5	260
12	50 / 56	M / F	- / -	LNH	Réponse partielle	F-TBI	CSA-MMF	14	481,3
13	43 / 47	M / M	- / +	LNH	Réponse partielle	F-TBI	CSA-MMF	4,6	359,8
14	41 / 46	M / M	- / -	LNH	Progression	F-TBI	CSA-MMF	5	130,9
15	27 / 53	M / M	- / -	LA	Progression	F-Bus-ATG	CSA	13,7	166,3
16	62 / 61	M / M	- / -	LA	Réponse complète	F-TBI	CSA-MMF	9,5	225,4
17	49 / 46	F / F	+ / +	cancer de l'ovaire	Progression	F-Bus-ATG	CSA	7,8	
18	65 / 53	F / M	+ / +	LA	Réponse complète	F-Bus-ATG	CSA	5,1	258,7
19	34 / 44	M / M	- / +	myélofibrose	Progression	F-TBI	CSA-MMF	12	
20	42 / 50	M / M	+ / -	carcinome renal	Progression	F-Bus-ATG	CSA-MMF	5	170,2

Ara-C : cytarabine, ATG : globulines anti-thymocytes, Bus : busulfan, CSA : ciclosporine, Cy : cyclophosphamide F : fludarabine, Ida : idarubicine, MMF : mycophénolate, MTX : méthotrexate, TBI : irradiation corporelle totale

## **C Numération des cellules et immunomarquages**

Le nombre de lymphocytes a été évalué par un automate HST 201 (Sysmex, Kobe, Japon) à différentes temps post greffe.

Les différents prélèvements post transplantation n'ayant pas été effectués à la même date, nous avons choisi de les regrouper en 6 périodes :

- de 30 à 60 jours après la greffe (M +1.5)
- de 61 à 100 jours post greffe (M +2.5)
- de 101 à 150 jours post greffe (M +4)
- de 151 à 300 jours post greffe (M +7.5)
- de 301 à 365 jours post greffe (M +11)
- de 366 à 730 jours post greffe (M +18)

Les sous populations lymphocytaires ont été étudiées par immunomarquages directs.

Dans un premier temps (de façon prospective), le sang est incubé 20 minutes à température ambiante avec les anticorps CD3-FITC, CD8-PE (Diacclone, Besançon, France), CD8-FITC, CD19-FITC, CD57-FITC, CD4-APC (Beckman Coulter, Roissy, France), CD56-PE et anti HLADR-PE (Becton Dickinson, Le pont de Claix, France). Les globules rouges sont ensuite lysés à l'aide de la solution FACS Lysing (Becton Dickinson) et l'analyse des marquages est réalisée par cytométrie en flux (FACS CALIBUR, Becton Dickinson). L'acquisition de 2500 évènements dans la région taille / structure correspondant aux lymphocytes est nécessaire. Les fréquences obtenues sont converties en nombres absolus en multipliant le pourcentage de lymphocytes marqués par le nombre absolu de lymphocytes.

Dans un second temps et de façon rétrospective, les leucocytes, qui avaient préalablement été congelés, sont incubés 20 minutes à 4°C avec les anticorps CD3-FITC, CD45RA-FITC, CD8-PE (Diacclone), CD57-FITC, CD19-FITC, CD45RO-CyChrome, CD4-APC (Beckman Coulter) et CD28-FITC, CD27-PE, CD45RO-PE, CD56-PE, CD57-PE, CD45RA-PC5, CD4-APC, CD8-APC et anti HLADR-PE (Becton Dickinson). Après fixation avec une solution de formaldéhyde 2%, les cellules sont analysées par cytométrie en flux. Pour ces marquages, l'acquisition de 5000 évènements dans la région taille / structure correspondants aux lymphocytes est nécessaire.

## **D Quantification des TREC**

La quantification des TREC est réalisée rétrospectivement par PCR quantitative en temps réel. Les séquences des amorces et de la sonde fluorescente sont résumées dans le **tableau 5**.

Pour la PCR, 500ng d'ADN génomique sont placés avec le tampon Master Mix PCR probe 2X Quantitect (Qiagen, Courtaboeuf, France ; contenant ADN polymérase Holstar, dNTP et MgCl<sub>2</sub> (8mM)), 10pmol de chaque amorce et 5pmol de sonde fluorescente. La PCR, composée d'un cycle de dénaturation / activation de l'enzyme (95°C pour 10 minutes) et de 50 cycles d'amplification (94°C pour 30s, 60°C pour 30s) a été réalisée sur LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France). Une série de dilutions standards de plasmides contenant la séquence TREC a été utilisée pour quantifier les TREC dans chaque échantillon d'ADN.

Parallèlement, la quantification d'un gène de référence (GAPDH) a été réalisée. Les séquences des amorces et de la sonde sont réunies dans le tableau 3.

Les quantifications ont été effectuées sur les ADN à 7,5 et 11 mois post greffe. Les résultats sont exprimés en faisant la moyenne des nombres de copies de TREC normalisée par le nombre moyen de copies de GAPDH.

**Tableau 5 : Séquences des sondes et amorces utilisées pour la quantification des gènes TREC et GAPDH**

	séquences
TREC sens	5'-GCC AGC TGC AGG GTT TAG G-3'
TREC antisens	5' CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA CAC CTC-3'
TREC sonde	5'-FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-TAMRA-3'
GAPDH sens	5'-GAG ATG GTG CAG AAC CTC AT-3'
GAPDH antisens	5'-CCA AAT TCA TCG AAA TAG CC-3'
GAPDH sonde	5'-FAM-CAC CAC AGA GGC CCA AGG TC-TAMRA-3'

## **E Analyse du chimérisme**

L'analyse du chimérisme a été réalisé sur moelle osseuse ou cellules nucléées du sang périphérique à 2,5 ; 7,5 et 11 mois post transplantation. Le pourcentage de chimérisme donneur – receveur a été évalué par PCR semi-quantitative des séquences STR (short tandem repeat) spécifique du donneur et du receveur. La quantification a été analysée par le logiciel GeneScan (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).





# RESULTATS

# ***I Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisées par G-CSF***

---

## **A Description des donneurs**

Vingt quatre donneurs ont été inclus dans l'étude clinico-biologique.

Les donneurs remplissent toutes les conditions nécessaires au don de CSP et ont signé un consentement pour leur inclusion dans l'étude. Les caractéristiques des donneurs et de leur suivi sont résumées dans le **tableau 6**.

L'âge médian des donneurs au moment du don de CSP est de 48,1 ans (23,3 – 57,9), 15 sont des femmes et 9 des hommes. En médiane, ils ont reçu 9 injections de G-CSF (5 – 11) à raison de 2 injections par jour, et la quantité de cellules CD34+ nécessaires a été collectée par 1 cytophérèse (0 – 3). Le suivi des donneurs est de 3 (n = 2), 6 (n = 4) et 12 mois (n = 18) après leur don de CSP.

La mobilisation des cellules CD34+ de la moelle vers le sang périphérique a échoué pour le donneur D002 qui pourtant a reçu 11 injections de G-CSF. En effet, le taux de cellules CD34+ présentes dans le sang n'ayant que très peu augmenté après 11 injections de G-CSF, les médecins ont finalement effectué un prélèvement de moelle osseuse. Ce donneur n'a cependant pas été exclu de notre étude, car un tel cas n'a pas été prévu dans le protocole. De plus, les échecs étant des événements rares, il était intéressant de pouvoir analyser un tel cas, en comparaison avec le reste de la cohorte, mobilisée avec succès.

**Tableau 6 : Caractéristiques des donneurs de CSP inclus**

Donneur	Sexe	Age (au moment du don)	Nombre d'injection de G-CSF	Nombre de cytophérèse	Suivi post don (mois)
D001	M	32,8	9	2	12
D002	F	55,5	11	0	12
D003	F	54,8	9	2	12
D004	F	49,6	9	3	12
D005	M	56,2	9	2	12
D006	F	57,7	9	2	12
D007	F	49,3	7	2	12
D008	F	46,9	9	1	12
D009	F	57,1	9	1	12
D010	M	23,2	7	1	12
D011	F	57,9	9	1	12
D012	M	23,6	9	1	12
D013	M	52,0	10	1	12
D014	F	53,8	9	1	12
D015	M	42,8	10	1	12
D016	F	52,5	9	2	12
D017	M	52,9	9	1	12
D018	M	30,4	9	1	6
D019	M	29,2	10	2	12
D020	F	45,1	8	1	6
D021	F	44,8	7	3	6
D022	F	25,6	5	2	6
D023	F	25,8	8	1	3
D024	F	41,6	9	2	3
		<b>48,10</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>12</b>

Les prélèvements P1 et P2 sont effectués respectivement  $27,8 \pm 5,5$  et  $5 \pm 0,8$  avant le jour de la première cytophérèse (P3 à J0). Les autres prélèvements (P4 à P8) sont réalisés respectivement  $0,8 \pm 0,2$  ;  $32,2 \pm 0,8$  ;  $92 \pm 0,7$  ;  $184,6 \pm 1,2$  et  $370,6 \pm 2,8$  jours après cette première cytophérèse.

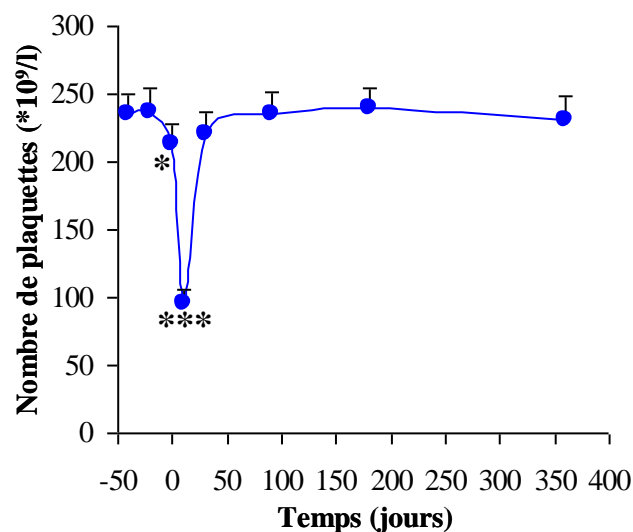
Pour clarifier les différentes figures qui suivent, nous avons choisi de situer, de façon arbitraire, les prélèvements P1 à P8 au jour -40, -20, 0, 10, 30, 90, 180, 360.

La moyenne des valeurs obtenues aux points P1 et P2 servira de valeur de référence ou valeur normale, à laquelle seront comparées les valeurs obtenues aux différents points post G-CSF (P3 à P8) en utilisant un test t.

## **B Evolution des numérations cellulaires**

Pour chaque paramètre étudié, nous avons comparé les valeurs obtenues pour les prélèvements post G-CSF (P 3 à P 8) à la moyenne des valeurs obtenues pour les prélèvements pré G-CSF (P 1 et P 2) dite valeur normale ou de référence.

Comme décrit par Tassi *et al* (Tassi *et al.*, 2005), les numérations plaquettaires sont légèrement mais significativement ( $p = 0,017$ ) diminuées au moment de la mobilisation par G-CSF (**figure 11**). Cette diminution est fortement accentuée après les cytophèreses, et certains donneurs atteignent même la valeur très basse de  $24 \times 10^9$  plaquettes par litre de sang (D004 et D005). En moyenne, les numérations sont revenues à la valeur de référence un mois après le don, cependant, 3 donneurs ont encore un nombre de plaquettes inférieur à  $100 \times 10^9$  / l, et un donneur (sur 22) ne retrouve une valeur de référence qu'à 6 mois post don (D004).

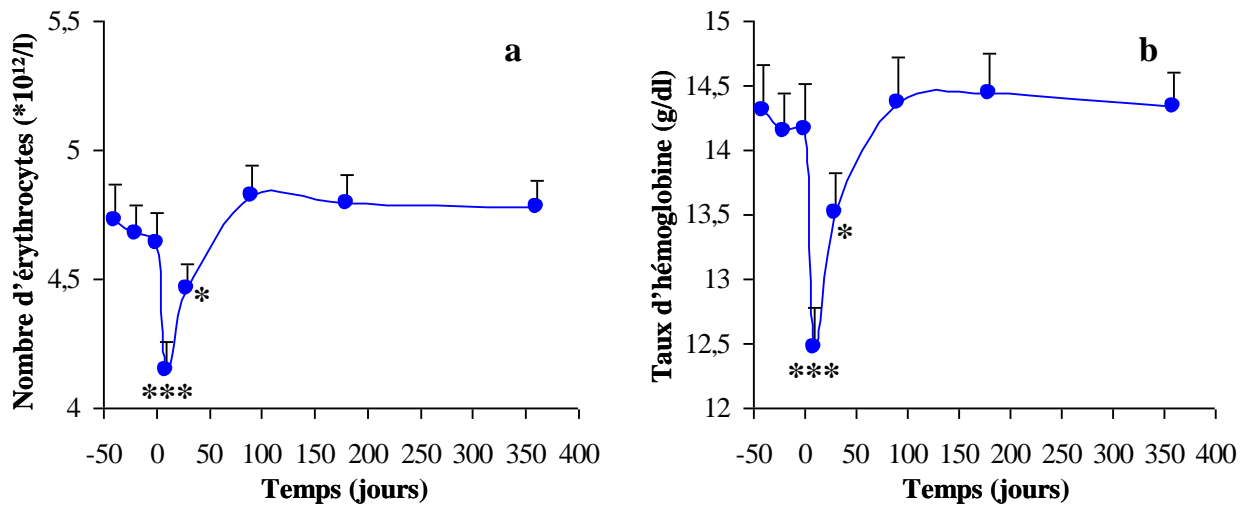


**Figure 11 : Numérations plaquettaires**

La moyenne ( $\pm$  déviation standard) du nombre de plaquettes obtenu pour chaque donneur est représentée pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2).\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Les numérations érythrocytaires sont très faiblement et non significativement diminuées par le traitement par G-CSF et deviennent significativement ( $p < 10^{-5}$ ) diminuées après le don (**figure 12a**). Les numérations des globules rouges sont de retour à la valeur de référence dès le 3<sup>ème</sup> mois post cytophèrese. De la même façon, le taux d'hémoglobine (**figure 12b**) et l'hématocrite (non montré) sont fortement diminués après le don et reviennent à une valeur

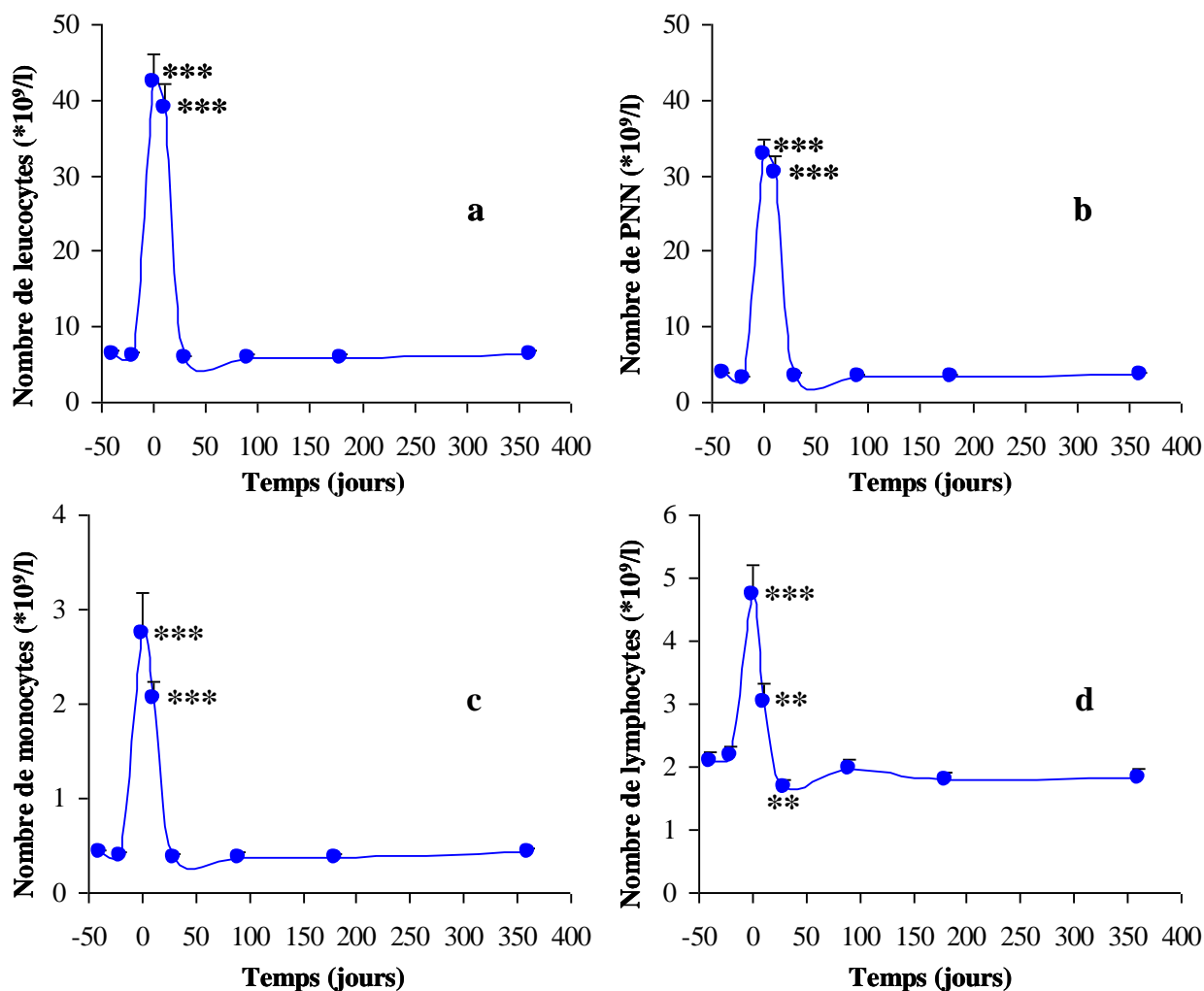
normale 3 mois après. Nous confirmons ainsi des données préalablement montrées (Korbling *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1996).



**Figure 12 : Représentation des numérations érythrocytaires et du taux d'hémoglobine**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) du nombre de globules rouges (a) et du taux d'hémoglobine (b) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2).  
 \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Les numérations des globules blancs (**figure 13a**), des polynucléaires neutrophiles (**figure 13b**), des monocytes (**figure 13c**) et des lymphocytes (**figure 13d**) sont très significativement ( $p < 10^{-5}$ ) augmentées par la mobilisation par G-CSF et restent significativement, mais de façon moindre, élevées après le don. Le nombre de globules blancs, de polynucléaires neutrophiles et de monocytes ont retrouvés une valeur proche de celle de référence au bout d'un mois. En revanche, le nombre de lymphocytes est d'abord inférieur à la valeur de référence à un mois post don et revient à une valeur normale au bout de 3 mois.



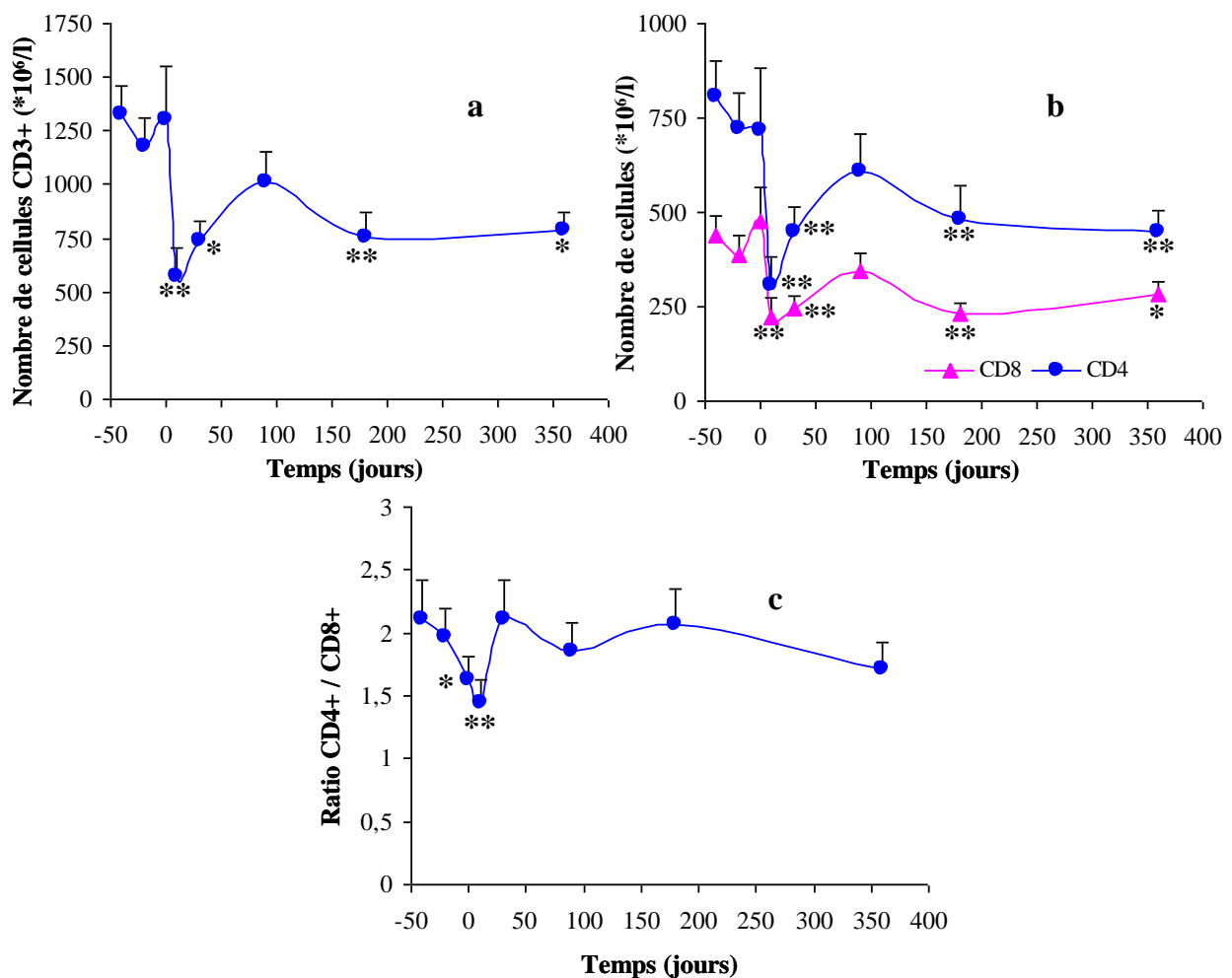
**Figure 13 : Numérations des globules blancs, polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes et lymphocytes**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des nombres de globules blancs (a), polynucléaires neutrophiles (b), monocytes (c) et lymphocytes (d) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Concernant le donneur D002 pour qui la mobilisation des cellules CD34+ a échoué, les numérations cellulaires évoluent de la même manière que pour les autres donneurs au moment de la mobilisation. En revanche, le retour à la valeur de référence est plus lent. En effet, les numérations des globules blancs et des polynucléaires neutrophiles ne reviennent à une valeur normale qu'au bout de 3 mois et pour celles des monocytes et lymphocytes, il faut attendre un an après la mobilisation. Ceci est peut-être dû à la réalisation d'un prélèvement de moelle au lieu d'une cytophérèse, plutôt qu'à la mobilisation elle-même.

## C Analyse des sous populations lymphocytaires

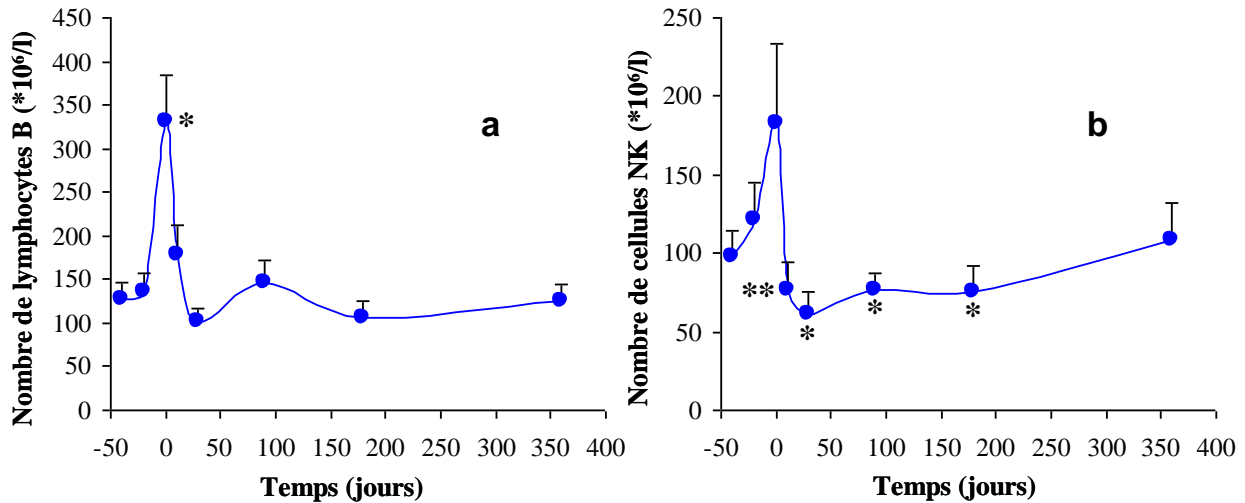
Les numérations des lymphocytes CD3+, CD4+ et CD8+ ne sont pas affectées par la mobilisation par G-CSF mais sont significativement diminuées par le don de CSP. Un an après la mobilisation, les numérations cellulaires CD3+ sont toujours plus faibles que les valeurs de référence (**figure 14a**). De même, les numérations des cellules CD4+ et CD8+ ne sont toujours pas revenues à la normale un an après le don de CSP (**figure 14b**). Le ratio CD4 / CD8 s'inverse au moment de la mobilisation et du don de CSP mais avec un retour à la normale dès le 1<sup>er</sup> mois (figure 8c).



**Figure 14 : Numérations des cellules CD3+, CD4+ et CD8+ et ratio CD4+/CD8+**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des nombres de cellules CD3+ (a), cellules CD4+ ou CD8+ (b) des ratios CD4+/CD8+ (c) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Les numérations des cellules NK (CD3- CD8+) et des lymphocytes B sont augmentées par la mobilisation (x 1,7 pour les NK et x 2,5 pour les B), elles sont ensuite diminuées par les cytophèreses. Le retour à une valeur normale est observé dès le prélèvement P4 pour les cellules B (**figure 15a**) et un an après pour les cellules NK (**figure 15b**).



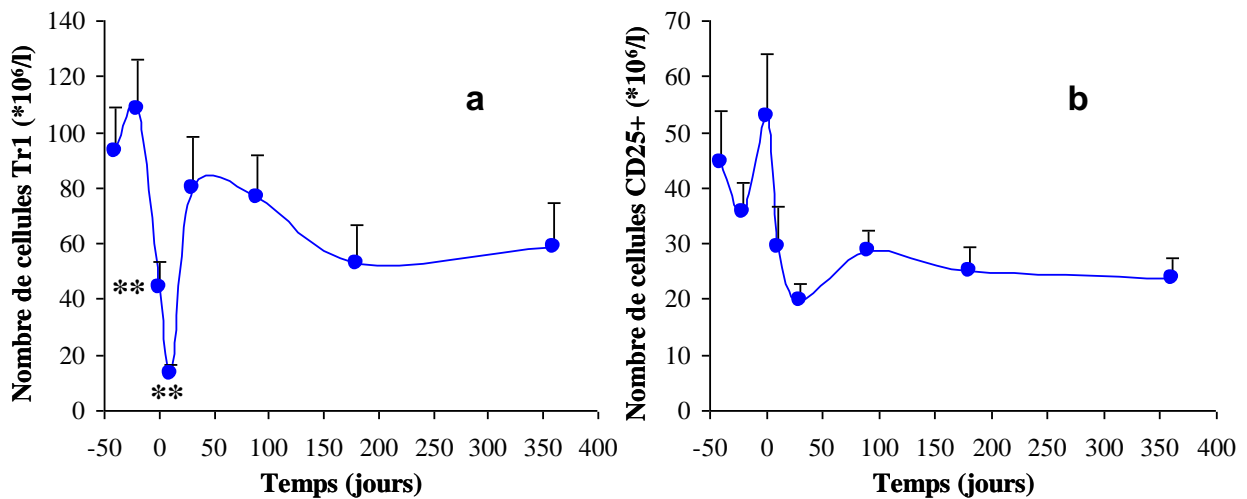
**Figure 15 : Numérations des lymphocytes B et des cellules NK**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des nombres de lymphocytes B (a) et de cellules NK (b) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Ensuite, nous avons observé l'effet de la mobilisation par G-CSF sur différentes sous populations cellulaires telles que les cellules régulatrices, les cellules dendritiques ou encore, les cellules activées.

Les numérations des cellules régulatrices de type 1 (Tr1) de phénotype CD4+, CD18+, CD49b+ sont significativement diminuées par la mobilisation (cette diminution est accentuée par le don de CSP) mais une valeur normale est rapidement retrouvée un mois après la mobilisation (**figure 16a**). D'autre part, nous avons observé l'évolution des numérations des cellules de type régulatrice CD4+ CD25+. Celles-ci sont augmentées légèrement et non significativement par la mobilisation par G-CSF (**figure 16b**).



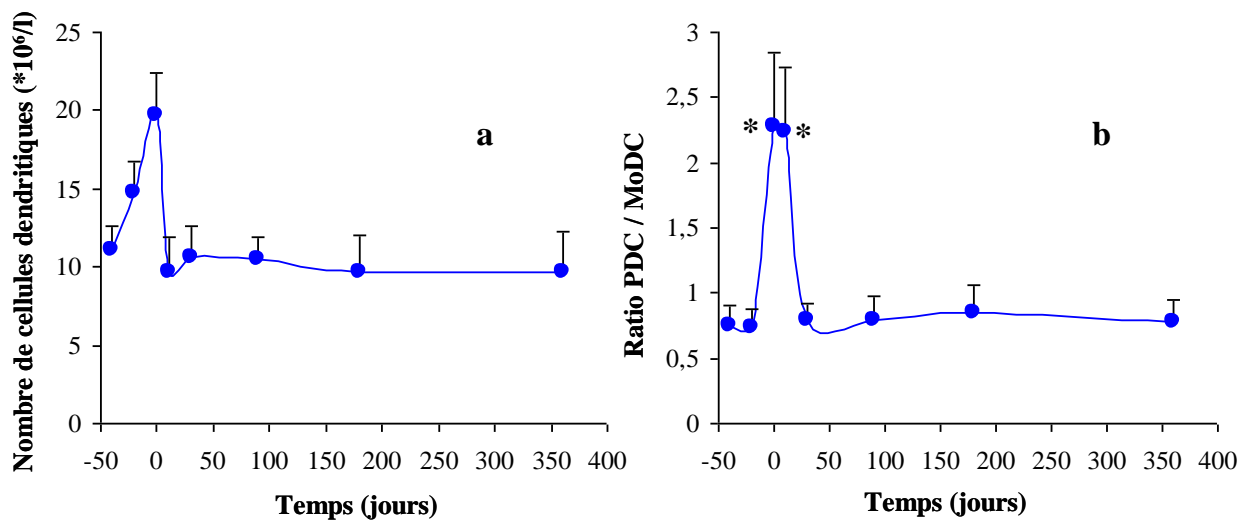


**Figure 16 : Numérations des lymphocytes, de type régulateur, Tr1 (CD4+ CD18+ CD49b+) et CD4+ CD25+**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des nombres de lymphocytes Tr1 CD3+ CD4+ CD18+ CD49b+ (a) et de cellules type régulatrice CD3+ CD4+ CD25+ (b) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Nous nous sommes ensuite intéressés aux 2 types de cellules dendritiques.

Le nombre de celles-ci est augmenté (mais de façon non significative) par le traitement par G-CSF (**figure 17a**), mais il retrouve rapidement une valeur normale (dès P4). Cette augmentation est essentiellement due aux PDC, en effet, le nombre de PDC est multiplié par 2 au moment de la mobilisation alors que le nombre de MoDC n'est que légèrement augmenté (x 1,1 non significatif). De ce fait, le rapport PDC / MoDC (**figure 17b**) est inversé en faveur des PDC au moment de la mobilisation (P3 et P4).



**Figure 17 : Numération des cellules dendritiques (PDC et MoDC) et ratio PDC / MoDC**

La moyenne ( $\pm$  déviation standard) des nombres de cellules dendritiques (PDC + MoDC) (a) et les ratios PDC / MoDC (b) obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

La présence d'autres marqueurs a également été étudiée afin de vérifier l'état d'activation (CD95 et HLA-DR) des cellules ainsi que leur niveau de différenciation (CD45RA et CD45RO).

L'expression de certains marqueurs d'activation à la surface des cellules T CD3+ CD4+ ou T CD3+ CD8+ n'est pas significativement modifiée par la mobilisation par G-CSF (P3). En effet, une faible augmentation du pourcentage de cellules exprimant HLA-DR a été mise en évidence aussi bien au niveau des cellules CD3+ CD4+ (x 3) qu'au niveau des cellules CD3+ CD8+ (x 1,5). En revanche, l'expression du marqueur CD95 est légèrement augmentée en pourcentage mais seulement sur les cellules CD3+ CD8+ après mobilisation (x 1,3). De façon générale, le nombre des cellules CD4+ ou CD8+ activées (CD95+ ou HLADR+) est ensuite diminué (mais toujours de manière non significative) par le don de CSP (P4).

L'expression des marqueurs spécifiques des cellules naïves (CD45RA) et mémoires (CD45RO) a été étudiée sur les cellules T CD3+ CD4+ et T CD3+ CD8+, mais aussi sur les cellules B CD19+. Sur les lymphocytes T CD4+, l'expression des marqueurs CD45RA et CD45RO n'est pas affectée par la mobilisation par G-CSF, mais elle diminue suite aux cytophèreses pour un retour à une valeur normale un mois après. Sur les cellules T CD8+,

l'expression de CD45RA et CD45RO augmente au moment de la mobilisation par G-CSF (respectivement, x 3,1 et x 4,2) pour revenir à la normale après les cytophèreses. En ce qui concerne les lymphocytes B, il y a augmentation significative de l'expression des 2 marqueurs par le traitement par G-CSF et retour rapide à une valeur normale (x 3,2 pour CD45RA et x 3,4 pour CD45RO).

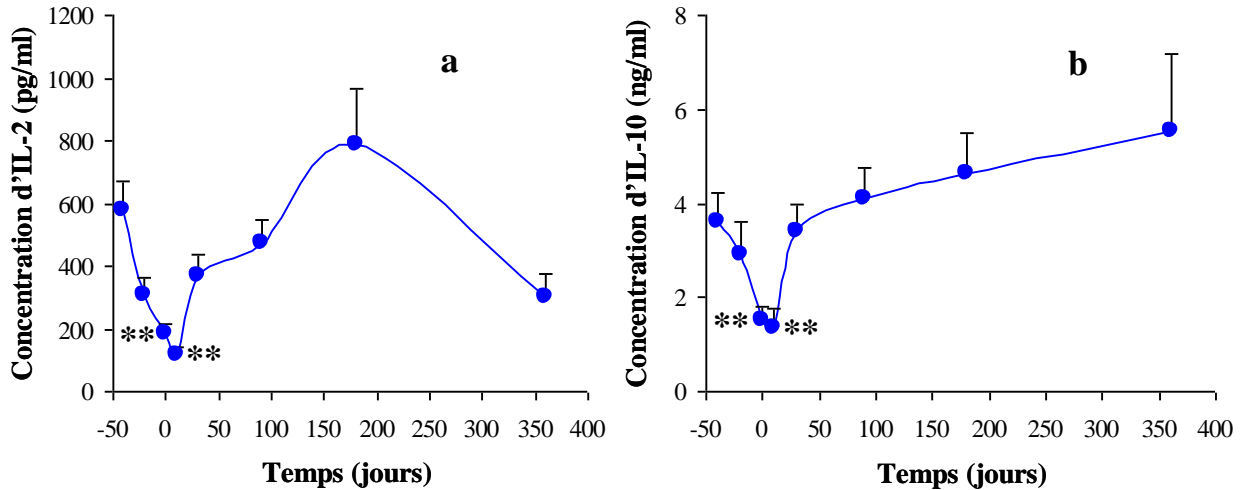
## **D Quantification des cytokines**

Afin d'étudier l'impact de la mobilisation par G-CSF sur la fonctionnalité des cellules immunitaires, nous avons évalué le potentiel de synthèse des cytokines par les cellules T activées par PHA *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé une méthode permettant de détecter simultanément 10 cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.

Les résultats obtenus sont difficilement interprétables. En effet, les variabilités intra-donneurs de production de cytokines sont importantes et rendent difficiles l'interprétation des résultats. Les résultats des dosages de l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1- $\beta$ , l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-12 ne sont pas interprétables. D'autre part, la mobilisation par G-CSF ne semble pas affecter la production de TNF- $\alpha$ .

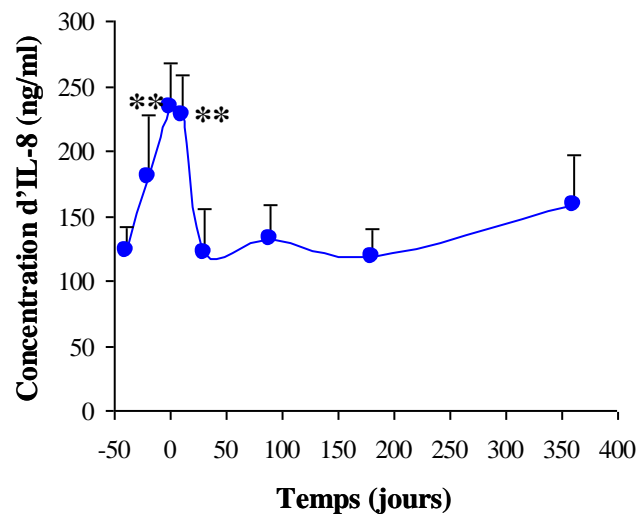
Les potentiels de production de l'IL-2 (**figure 18a**) et de l'IL-10 (**figure 18b**) sont significativement diminués au moment de la mobilisation par G-CSF.

Au contraire, celui de l'IL-8 est significativement augmenté par la mobilisation (**figure 19**). Cette augmentation est également remarquée au niveau de la production de l'IL-6, mais de manière non significative. Les niveaux de production des cytokines qui sont affectées par le traitement sont de retour à un niveau normal un mois après le don.



**Figure 18 : Concentrations d'IL-2 et d'IL-10 synthétisées par les lymphocytes T en réponse à une stimulation de 24 heures par PHA**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des concentrations d'IL-2 (a) et d'IL-10 (b) synthétisées par les lymphocytes T en réponse à une stimulation PHA (24h) obtenues pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$



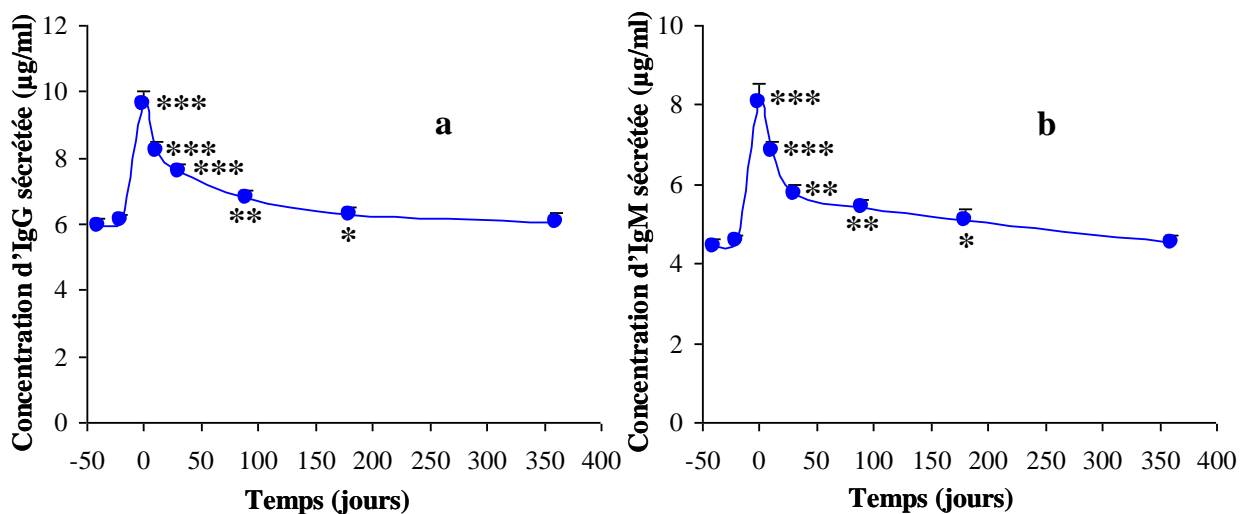
**Figure 19 : Concentration d'IL-8 synthétisée par les lymphocytes T en réponse à une stimulation par PHA**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) de la concentration d'IL-8 synthétisée par les lymphocytes T en réponse à une stimulation PHA (24h) obtenue pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

## E Quantification des immunoglobulines

Nous avons montré ci-dessus l'augmentation de l'expression du marqueur CD45RO après la mobilisation. Ceci, ainsi que l'observation d'une immunisation anti-HLA (Lapierre *et al.*, 2002) et anti-ABO (Lapierre *et al.*, 2001) après greffe de CSP suggèrent que la mobilisation par G-CSF pourrait « primer » les cellules B. Ainsi, nous avons étudié le potentiel des cellules B à produire des immunoglobulines en réponse à une stimulation par PWM *in vitro*.

La mobilisation par G-CSF induit significativement la production d'immunoglobulines G (figure 20a x 1,7) et M (figure 20b x 1,9). Leur niveau de production diminue progressivement dès le don de CSP (P4) et retrouve une valeur dite normale 3 et 6 mois après mobilisation pour, respectivement, les IgG et les IgM.



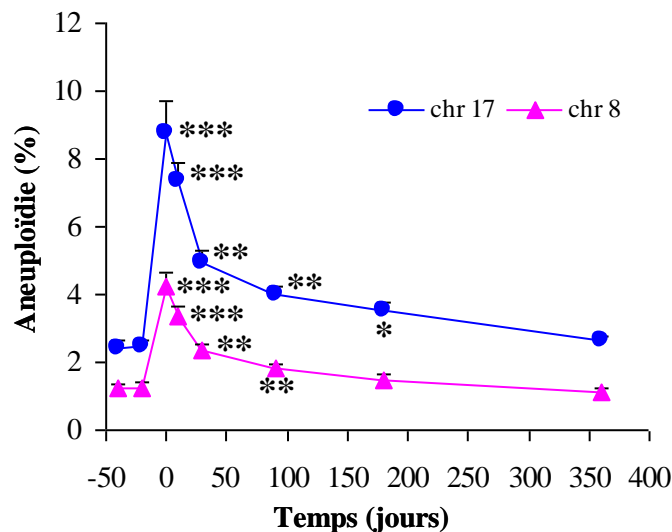
**Figure 20 : Concentrations d'IgG (a) et d'IgM (b) sécrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation de 14 jours par du pokeweed mitogen**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des concentrations d'IgG (a) et d'IgM (b) sécrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation PWM (14 jours) obtenues pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

## F Analyses cytogénétiques

En 2004, Nagler *et al* ont montré des cas d'aneuploïdie du chromosome 17 associés à une mobilisation par G-CSF (Nagler *et al.*, 2004). Nous avons choisi d'étudier, grâce à une technique de FISH, les aneuploïdies des chromosomes 8 et 17. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence des cellules monosomiques, trisomiques ou multisomiques (présence de plus de 3 chromosomes) pour les chromosomes 8 et 17.

Au moment de la mobilisation par G-CSF (P3), les moyennes des pourcentages de cellules comportant des anomalies chromosomiques 8 et 17 sont augmentées respectivement de 3,4 et 3,6 fois (**figure 21**). Les fréquences des cellules aneuploïdes (8 et 17) diminuent lentement mais ne reviennent à une valeur normale que 6 mois après le don pour les aneuploïdies du chromosome 8 et un an après le don pour les aneuploïdies du chromosome 17. Cependant, les fréquences de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17 sont supérieures à leur valeur de référence un an après la mobilisation pour respectivement 4 et 7 donneurs (n = 18).



**Figure 21 : Représentation des pourcentages de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17**

Les moyennes ( $\pm$  déviation standard) des pourcentages de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17 obtenus pour chaque donneur sont représentées pour les 8 prélèvements. Les différentes valeurs obtenues aux prélèvements P3 à P8 sont comparées à la valeur de référence (moyenne des valeurs obtenues à P1 et P2). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\* :  $p < 10^{-5}$

Pour chaque prélèvement (P1 à P8) et chaque chromosome, nous avons observé que la fréquence de cellules monosomiques est plus élevée que celle des cellules trisomiques. Les cellules multisomiques sont présentes essentiellement au moment du traitement par G-CSF

(P3, P4 et P5) mais restent moins fréquentes que les autres types de cellules anormales (**tableau 7**). En effet, seulement 4 (pour le chromosome 8) et 5 (pour le chromosome 17) donneurs présentent des cellules multisolomiques avant la mobilisation alors que 20 donneurs pour le chromosome 8 et tous les donneurs (n = 24) en ont après mobilisation.

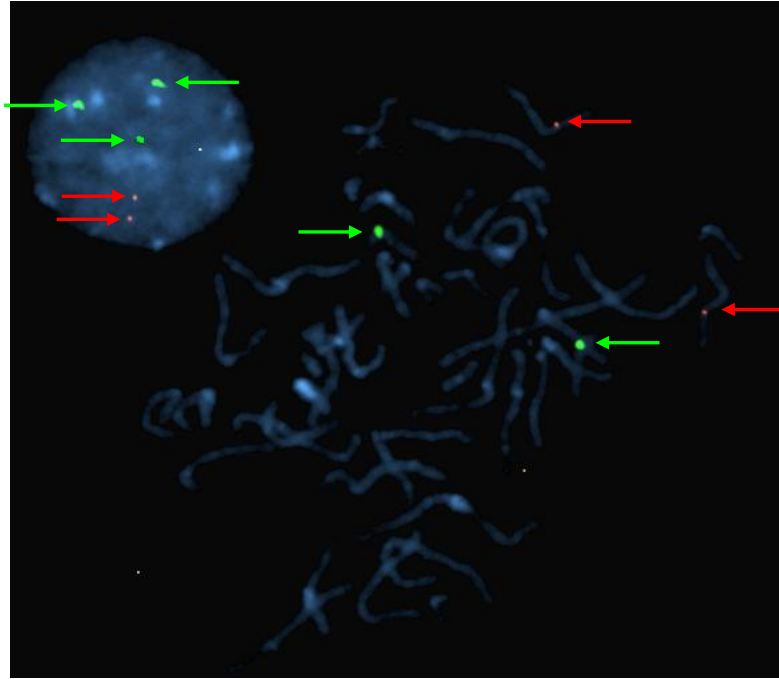
**Tableau 7 : Valeur de référence et facteur d'induction des pourcentages de cellules monosomiques, trisomiques et multisolomiques pour les chromosomes 8 et 17.**

	Valeur de référence (Moyenne P1 - P2)	Facteur d'augmentation après mobilisation (P3)
monosomie 8	0,66 ± 0,1	2,66 ± 1,9 (p<10 <sup>-5</sup> )
trisomie 8	0,58 ± 0,08	2,57 ± 2,47 (p<10 <sup>-4</sup> )
multisolomie 8	0,02 ± 0,01	48 ± 15 (p<10 <sup>-5</sup> )
monosomie 17	1,58 ± 0,15	2,37 ± 3,27 (p<10 <sup>-4</sup> )
trisomie 17	0,83 ± 0,12	3,71 ± 2,75 (p<10 <sup>-5</sup> )
multisolomie 17	0,02 ± 0,014	97,15 ± 18,43 (p<10 <sup>-5</sup> )

Dans un second temps, nous avons regardé, sur les prélèvements de deux donneurs, si les cellules CD34+ utilisées pour la greffe au patient étaient atteintes par ces anomalies. Pour cela, nous avons trié les cellules CD34+ sur les prélèvements P3 et nous avons effectué des manipulations de FISH afin de visualiser les chromosomes 8 et 17 (pour les cellules CD34+ comme pour les cellules CD34-). Nous n'avons mis en évidence aucune anomalies, le taux d'aneuploïdie de ces échantillons est comparable au taux obtenus dans les prélèvements pré-G-CSF. En effet, les aneuploïdies sont retrouvées au niveau des cellules CD34-.

Des aneuploïdies ayant été mises en évidence au niveau des 2 chromosomes, nous avons voulu voir si d'autres chromosomes pouvaient être concernés par ces anomalies. Pour cela, nous avons réalisé des caryotypes sur les prélèvements P3 de quelques donneurs.

Les caryotypes réalisés sur les prélèvements P3 de 8 donneurs différents n'ont révélé aucune anomalie chromosomique alors que nous en avons montrée par la méthode FISH sur les chromosomes 8 et 17. Les anomalies décrites au niveau des chromosomes 8 et 17 ne sont pas retrouvées au caryotypage. De la FISH (8 et 17) réalisée sur ces mêmes lames ont montré que tous les noyaux à l'état métaphasique étaient normaux et des noyaux aneuploïdes ont été retrouvés exclusivement dans la fraction de noyaux interphasiques, dans des pourcentages identiques à ceux trouvés lors de la première analyse (**figure 22**).



**Figure 22 : Photo d'un noyau métaphasique normal et d'un noyau non métaphasique triploïde pour le chromosome 17**

Photo d'un noyau métaphasique (en bas et à droite) normaux (2 chromosomes 8 : 2 spots rouge et 2 chromosomes 17 : 2 spots vert) et d'un noyau non métaphasique (en haut et à gauche) triploïde pour le chromosome 17 (3 spots verts) et normal pour le chromosome 8 (2 spots rouges)



## ***II Etude de la reconstitution immunitaire après greffe de CSP***

---

### **A Suivi post greffe des patients**

Cette étude rétrospective a été réalisée afin d'évaluer la cinétique de reconstitution immunitaire, la sensibilité ou la résistance aux infections, l'alloréactivité des cellules T administrées dans un groupe de patients ayant reçus une greffe de CSP après un conditionnement d'intensité réduite ou non myélo-ablatif.

Toutes les caractéristiques concernant le suivi post greffe des patients (survenue de GVH ou d'infections, infusion de lymphocytes du donneur, durée du suivi...) sont résumées dans le **tableau 8**.

Au terme de l'étude (novembre 2003), 11 patients sont encore vivants et ont été suivis sur une durée médiane de 445 jours (208 – 1279) après leur greffe. Parmi ceux-ci, 6 sont en réponse complète, 2 en réponse partielle et pour 3 patients, la maladie progresse.

Les 9 autres patients sont décédés à 278 jours post-greffe (120 – 507). Les causes de décès sont variées, 2 patients sont disparus d'une rechute, 3 des suites d'une GVH chronique, 3 de la progression de leur maladie et un patient d'un syndrome de détresse respiratoire aigüe.

La survenue d'une GVH aigüe a été observée pour 18 patients, avec un temps médian de déclaration de 38 jours après la greffe (9 – 93). Pour un patient, cette GVH aigüe était de grade I, pour 11 patients, elle était de grade II et de grade III pour un autre receveur. D'autre part, 6 patients ont déclaré une GVH chronique avec un temps médian de survenue de 142 jours post greffe (100 – 180). Parmi ces 6 GVH chronique, 4 étaient extensives et 2 patients en sont mêmes décédés.

Seulement 2 patients ont déclaré une infection bactérienne sévère post transplantation. Un patient développe une infection à *Serratia* à J 127, et décèdera à J 128 post greffe d'une

progression de son lymphome. Le second patient développe une infection bactérienne à *Pseudomonas* à J135 et décède à J143 d'une évolution de sa LAM.

Nous avons également observé l'apparition d'antigènes anti-CMV asymptomatique chez 3 patients (J 30, 56 et 80 post greffe) ; en effet, aucun d'eux n'a déclaré de maladie à CMV. De plus, aucune lymphoprolifération induite par EBV n'a été documentée sur les 20 receveurs.

Des études du chimérisme ont été réalisées après la greffe. Le pourcentage médian de cellules CD3+ dérivées du donneur présentes chez le receveur est de 89 % (14 % - 100 %, n = 18 / 20), 100 % (76 % - 100 %, n = 12 / 16) et 100 % (n = 6 / 13) à 2,5, 7,5 et 11 mois post transplantation respectivement.

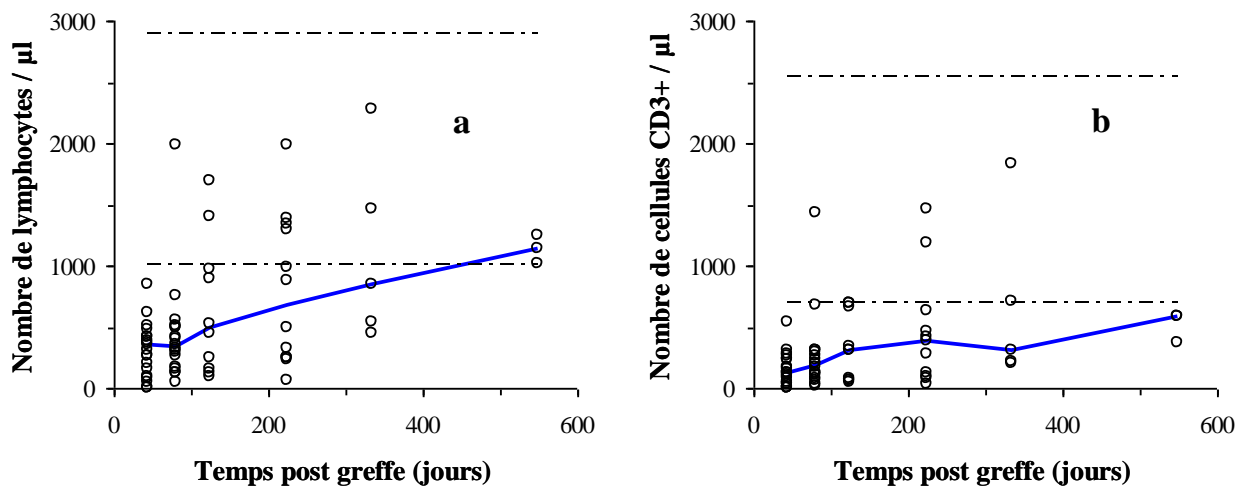
Tableau 8 : Caractéristiques post transplantation des patients

Patient	Infusion de lymphocytes du donneur (jour)	aGVH (jour)	cGVH (jour)	Infection bactérienne (jour)	Infection CMV (jour)	Suivi en novembre 2003	Cause du décès
1	106 et 197	grade II (35)				décédé à J343	détresse respiratoire
2	86 et 163					réponse complète à J1279	
3	84 et 120		extensive (140)			progression à J731	
4	393		limitée (100)			progression à J640	
5		grade II (9)	extensive (160)			décédé à J278	GVH
6		grade II (29)	extensive (144)		56	décédé à J179	GVH
7		grade II (11)			80	décédé à J120	progression
8			limitée (180)			décédé à J480	rejet
9	112 et 240					décédé à J507	rejet
10		grade II (93)				décédé à J308	GVH
11		grade II (45)				réponse complète à J422	
12		grade II (54)			30	réponse complète à J445	
13		grade II (40)				réponse complète à J452	
14		grade III (30)		127		décédé à J128	progression
15		grade II (30)	extensive (100)	135		décédé à J143	progression
16		grade II (38)				réponse complète à J529	
17						progression à J214	
18						réponse complète à J208	
19		grade I (45)				réponse partielle à J242	
20		grade II (83)				réponse partielle à J311	

## **B Reconstitution immunitaire**

La durée médiane d'aplasie est de 8 jours (0 – 15) pour les neutrophiles ( $> 500 / \mu\text{l}$ ) et de 12 jours (0 – 18) pour les plaquettes ( $> 20000 / \mu\text{l}$ ).

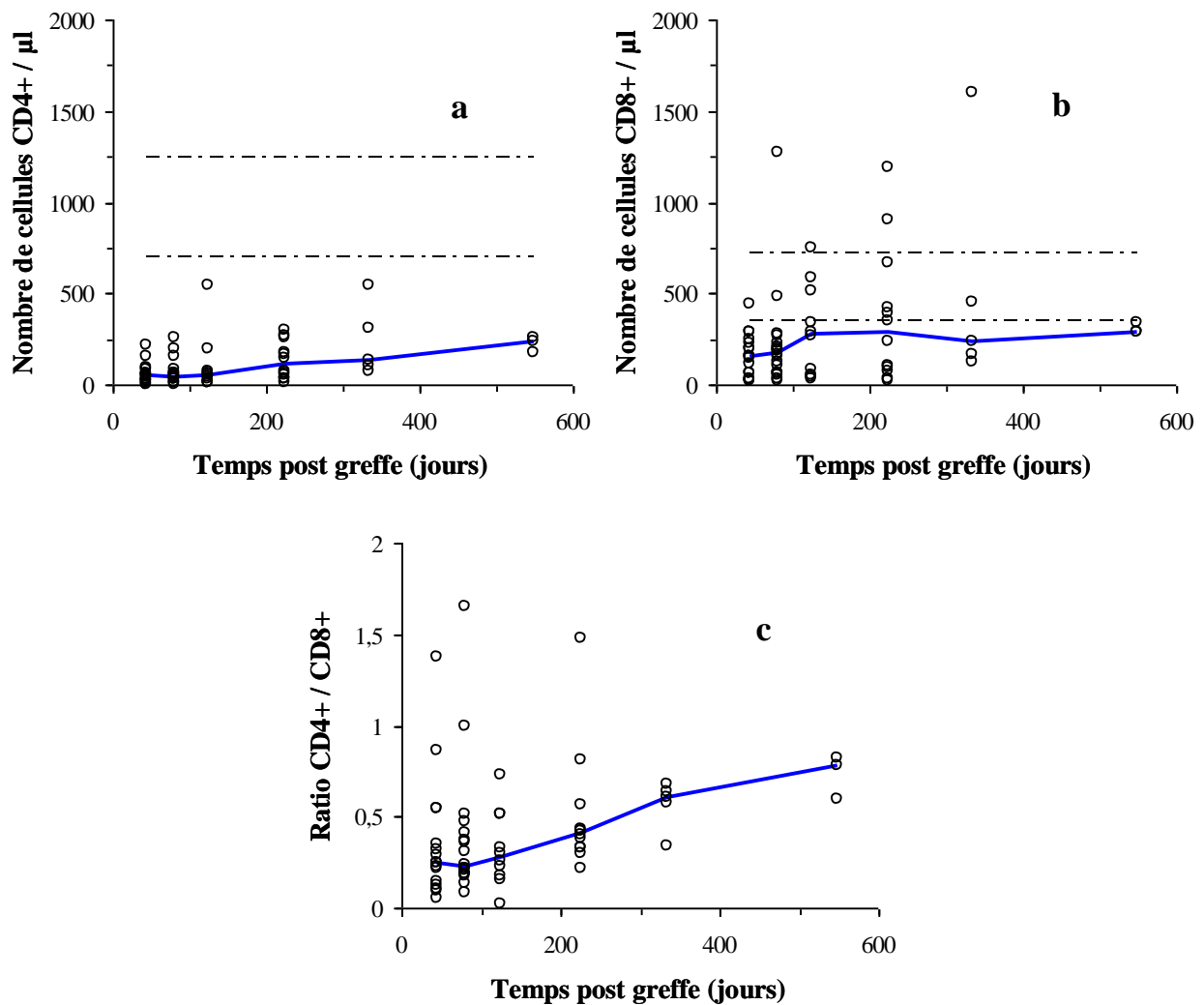
Plusieurs sous populations lymphocytaires ont été caractérisées et analysées à différents temps post transplantation de CSP mobilisées par G-CSF. Le nombre de lymphocytes augmente progressivement durant les premiers mois suivants la greffe, mais il n'atteint une valeur normale ( $> 1000 / \mu\text{l}$ ) que 18 mois après la greffe (**figure 23a**). De la même façon, les numérations des cellules CD3+ augmentent dès les premiers mois après la greffe, mais elles ne retrouvent une valeur normale ( $> 690 / \mu\text{l}$ ) que 18 mois après greffe (**figure 23b**).



**Figure 23 : Numérations des cellules lymphocytaires (a) et CD3+ (b)**

Pour chaque type de numération, les ronds représentent les valeurs obtenues pour chaque patient, la courbe bleue représente la médiane et les lignes horizontales les valeurs standards minimales et maximales. Les valeurs sont représentées aux temps médians des différentes périodes : 1,5 (17 patients), 2,5 (18 patients), 4 (10 patients), 7,5 (12 patients), 11 (5 patients) et 18 mois (3 patients).

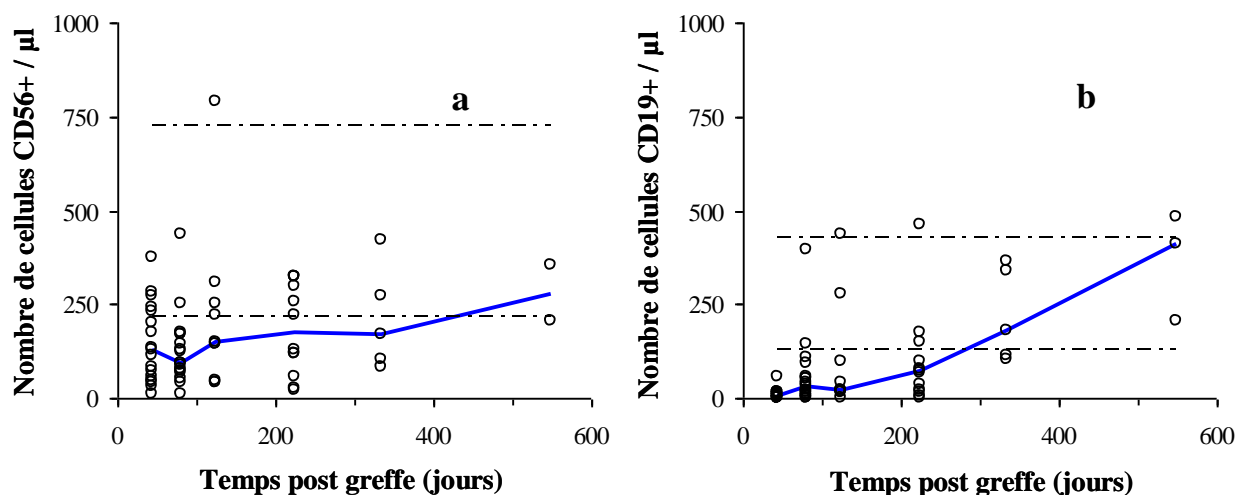
Le nombre de lymphocytes T CD4+ n'augmente que faiblement après la greffe, et il n'est toujours pas revenu à une valeur normale à la fin de notre étude (18 mois post greffe) (**figure 24a**). En revanche, les numérations de lymphocytes T CD8+ augmentent précocement après la greffe, s'approchent des valeurs normales dès 4 mois mais n'y sont toujours pas au bout de 18 mois (**figure 24b**). La cinétique de reconstitution des cellules T CD4+ et T CD8+ entraîne une inversion du ratio CD4 / CD8, et ceci durant toute la durée de l'étude (**figure 24c**).



**Figure 24 : Représentation des numérations des cellules CD4+ (a), CD8+ (b) et du ratio CD4+ / CD8+**

Pour chaque type de numération ou ratio, les ronds représentent les valeurs obtenues pour chaque patient, la courbe bleue représente la médiane et les lignes horizontales les valeurs standards minimales et maximales. Les valeurs sont représentées aux temps médians des différentes périodes : 1,5 (17 patients), 2,5 (18 patients), 4 (10 patients), 7,5 (12 patients), 11 (5 patients) et 18 mois (3 patients).

D'autre part, le nombre de cellules CD56+ augmente rapidement après la greffe et, est revenu à la normale 18 mois après la transplantation (**figure 25a**). Les numérations des lymphocytes B CD19+ augmentent pour atteindre une valeur normale au bout de 11 mois ; et sont même proches de la valeur normale supérieure à 18 mois post greffe (424 /  $\mu\text{l}$ ) (**figure 25b**).



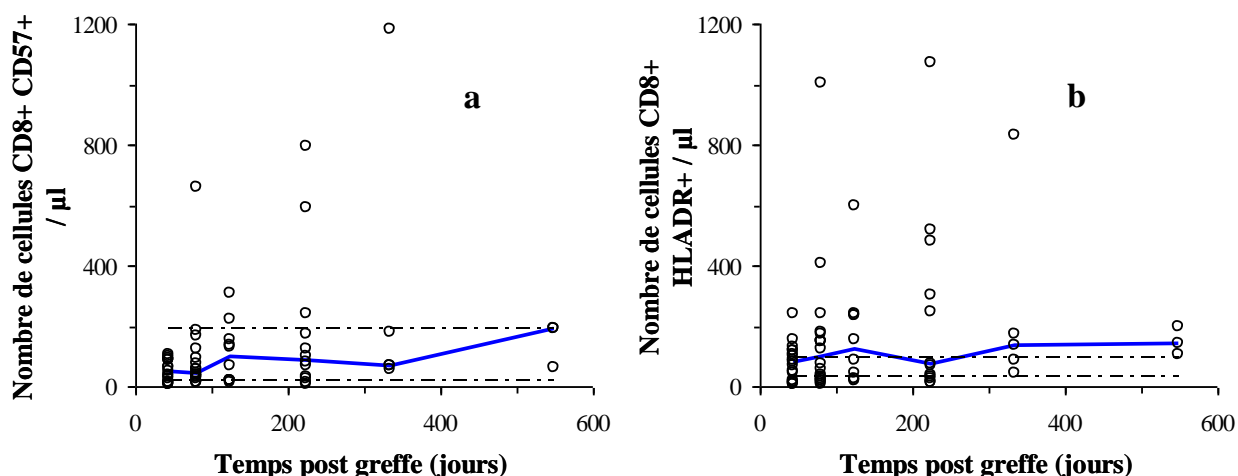
**Figure 25 : Numérations des cellules NK CD56+ (a) et des lymphocytes B CD19+ (b)**

Pour chaque type de numération, les ronds représentent les valeurs obtenues pour chaque patient, la courbe bleue représente la médiane et les lignes horizontales les valeurs standards minimales et maximales. Les valeurs sont représentées aux temps médians des différentes périodes : 1,5 (17 patients), 2,5 (18 patients), 4 (10 patients), 7,5 (12 patients), 11 (5 patients) et 18 mois (3 patients).

## **C Reconstitution des cellules T CD8+**

L'activation des cellules T CD8+ a été vérifiée par la présence de 2 marqueurs que sont CD57 et HLA-DR.

Les numérations des cellules activées T CD8+ CD57+ ou CD8+ HLADR+ sont déjà revenues à des valeurs normales 1,5 mois après la greffe (**figure 26a et b**). De plus, il a même été observé que le nombre de cellules T CD8+ HLA-DR+ est supérieur aux valeurs normales à différents temps post transplantation.



**Figure 26 : Numérations des lymphocytes CD8+ CD57+ (a) et des lymphocytes CD8+ HLADR+ (b)**

Pour chaque type de numération, les ronds représentent les valeurs obtenues pour chaque patient, la courbe bleue représente la médiane et les lignes horizontales les valeurs standards minimales et maximales. Les valeurs sont représentées aux temps médians des différentes périodes : 1,5 (17 patients), 2,5 (18 patients), 4 (10 patients), 7,5 (12 patients), 11 (5 patients) et 18 mois (3 patients).

Nous avons également analysé, sur quelques donneurs (n= 2 – 6), la répartition des cellules T CD8+ naïves (CD45RA+ CD27+), mémoires précoces (CD45RA- CD27+), mémoires tardives (CD45RA- CD27-) et effectrices (CD45RA+ CD27-) en utilisant un quadruple marquage en cytométrie en flux.

Les lymphocytes T CD8+ expriment majoritairement les phénotypes naïf, mémoire précoce et effecteur. En effet, nous avons observé, en moyenne, 43 % (34,5 – 46,5) (variant selon les temps post greffe) de cellules T CD8+ naïves, 29 % (14 – 32) de cellules T CD8+ mémoires précoces et 24 % (20,5 – 37) de cellules effectrices. Les lymphocytes T CD8+ mémoires tardives ne sont que faiblement représentées avec 5,5 % (3 – 9) (**tableau 9**).

**Tableau 9 : Pourcentage (moyenne ± déviation standard) des types cellulaires : mémoire précoce, naïf, mémoire tardif, effecteur parmi les cellules CD8+ à différents temps post transplantation**

	Temps post transplantation				
	45	80	124	225	333
<b>Mémoires précoces</b>	32 ± 10,5	29,2 ± 6,8	14,1 ± 4,6	25,8 ± 6,9	31,6 ± 14
<b>Naïves</b>	40,6 ± 6,2	43,2 ± 3,3	42,9 ± 1,6	46,5 ± 8,4	34,5 ± 12,7
<b>Mémoires tardives</b>	6,8 ± 2,8	3,8 ± 0,7	5,6 ± 0,6	3,3 ± 1,9	8,9 ± 5
<b>Effectrices</b>	20,6 ± 5,8	23,8 ± 4,6	37,4 ± 6,8	24,4 ± 13,4	25 ± 18,2

Sur ces différentes sous populations lymphocytaire CD8+, l'expression de la molécule CD28 a été étudiée par cytométrie en flux. Les cellules CD8+ naïves expriment ainsi le CD28 à

37 % (20 – 55) et les cellules CD8+ mémoires précoces l'expriment à 70 % (49 – 73). Les cellules CD8+ mémoires tardives et effectrices n'expriment pas le CD28.

## **D Reconstitution des cellules T CD4+**

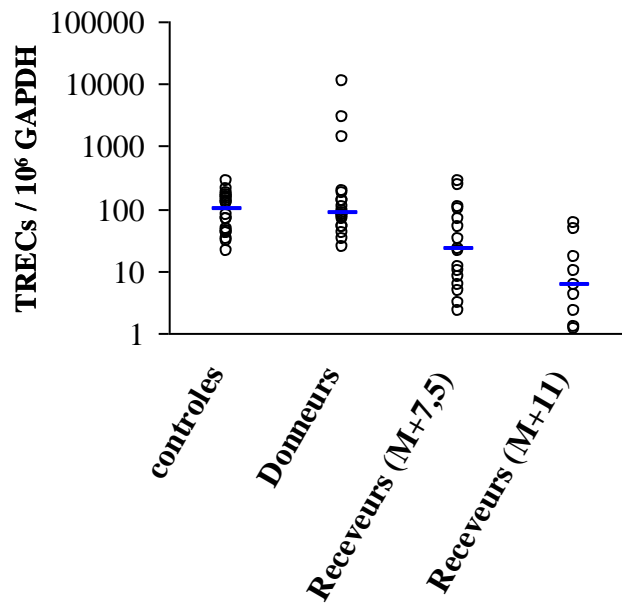
La normalisation du nombre des cellules CD4+ ne se fait que tardivement, cependant nous avons étudié la répartition des cellules naïves et mémoires grâce à la cytométrie en flux et aux marqueurs CD45RA et CD45RO.

Les cellules naïves (4+, 45RA+, 45RO-) sont quasiment indétectables et ceci pendant toute la durée de l'étude. En effet, elles ne représentent que 0,12 % (0 – 1,16) des cellules T CD4+. Les cellules mémoires (4+, 45RA-, 45RO+) sont majoritaires, représentant plus de 80 % des cellules CD4+, les autres cellules CD4+ sont dites intermédiaires (4+, 45RA+, 45RO+), c'est-à-dire qu'elles ont été récemment activées.

D'autre part, nous avons quantifié les TREC dans les cellules mononuclées des receveurs, 7,5 (16 patients) et 11 (9 patients) mois après la greffe. Nous avons comparé ces résultats aux quantifications des TREC des donneurs respectifs (19 donneurs), mais aussi à celles d'un groupe témoin de donneurs de sang âgés de moins de 25 ans (20 donneurs sains). Le groupe des donneurs de CSP a un âge médian de 50 ans (27 – 66) et celui des donneurs jeunes est de 19 ans (18 – 22).

La quantification des TREC des donneurs de CSP est similaire à celle des donneurs jeunes (99,2 et 81,4 copies /  $10^6$  copies de GAPDH respectivement). Le nombre de copies de TREC des patients à 7,5 mois est plus faible ; et encore plus faible à 11 mois ; que celui des donneurs de CSP (21,5 et 5,9 versus 81,4 copies /  $10^6$  copies de GAPDH) (**figure 27**). De plus, lorsque l'on compare le nombre de copies de TREC d'un patient avec celui du donneur respectif, nous pouvons mettre en évidence une différence significative.





**Figure 27 : Nombre de copies de TRECs, exprimé en copies de TREC par 10<sup>6</sup> copies de GAPDH**

Les ronds représentent les valeurs obtenues pour chaque quantification et les traits bleus représentent la médiane. Les valeurs sont représentées pour différents groupes : les contrôles (20 donneurs âgés de moins de 25 ans), les donneurs (19 donneurs respectifs des patients), les patients à 7,5 (16 patients) et 11 mois (9 patients) après la greffe.

En revanche, aucune corrélation n'a pu être détectée entre la quantification des TREC et l'âge du receveur ou le nombre de cellules CD34+ infusées ou le pourcentage de chimérisme ou l'administration de lymphocytes du donneur ou encore la survenue d'une GVH.



# **DISCUSSION**



Le G-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique souvent utilisé, non seulement chez les donneurs pour mobiliser les CSP de la moelle osseuse vers le sang périphérique, mais aussi chez les patients dans certains cas, pour traiter des neutropénies par exemple.

L'objectif de nos travaux était de vérifier l'effet de la mobilisation par G-CSF aussi bien sur les donneurs que sur les receveurs de CSP. Pour cela deux études ont été effectuées, une étude rétrospective réalisée sur 20 patients ayant reçus une greffe de CSP mobilisées par G-CSF, et une étude prospective réalisée sur 24 donneurs sains de CSP mobilisées par G-CSF.

L'étude clinico-biologique « Biovigilance des donneurs sains de CSP mobilisées par G-CSF » est destinée à évaluer la nature et surtout la durée des altérations fonctionnelles et génétiques des cellules après mobilisation par G-CSF. Plusieurs travaux ont déjà démontré l'impact de cette mobilisation sur les différentes cellules immunitaires, mais en règle générale, les équipes de recherche étudient l'impact du G-CSF au moment de la mobilisation et le suivi est donc de courte durée.

Comme il a été montré précédemment, nous avons confirmé l'augmentation des numérations de globules blancs, des polynucléaires neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes circulants au moment de la mobilisation, et une lymphopénie suite au don de CSP (Korbling et al., 1996; Martinez et al., 1996; Tayebi et al., 2001). Cette lymphopénie n'est plus significative dès le mois suivant le don et, pour la plupart des donneurs, les numérations leucocytaire, monocyttaire et lymphocytaire sont revenues à des valeurs normales un an après le don (Korbling et al., 1996; Martinez et al., 1996; Martinez et al., 1996). Chez certains donneurs, il a été montré qu'une neutropénie (Tassi et al., 2005), une monocytropénie (Storek et al., 2000) ou une lymphopénie (Tassi et al., 2005) peut cependant persister 1, et même 3 ans après les cytophèreses. L'analyse des sous populations lymphocytaires nous montre que la majorité des modifications, au niveau des numérations, induites par la mobilisation par G-CSF et les cytophèreses reviennent à la normale durant les 3 premiers mois. En effet, plusieurs sous populations ont retrouvées des valeurs normales 3 mois après mobilisation, mais nous démontrons que les numérations des cellules NK et T restent faibles respectivement 6 et 12 mois après le don. En revanche, la nature et la durée des altérations fonctionnelles des cellules des différentes sous populations sont moins connues. Il a tout de même été montré que la mobilisation par G-CSF induit des perturbations au niveau du transcriptome qui retrouvent un profil normal 2 mois après le traitement (Hernandez *et al.*, 2005).

Il a déjà été montré que la capacité des lymphocytes T et NK à produire des cytokines de type 1 ou pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) est sévèrement altérée par le G-CSF (Hartung et al., 1995; Reyes *et al.*, 1999; Boneberg *et al.*, 2002); au contraire, la production de cytokines de type 2 ou anti-inflammatoires est augmentée par le G-CSF (Mielcarek *et al.*, 1998; Hartung, 1999; Reyes et al., 1999). L'effet de la mobilisation par G-CSF sur la synthèse de l'IL-4 est controversé (Rondelli et al., 1998; Singh *et al.*, 1999; Nawa *et al.*, 2000; Sloand et al., 2000; Tayebi et al., 2001). Dans notre étude, nous montrons que la mobilisation par G-CSF entraîne la diminution de sécrétion de l'IL-2 et l'augmentation de celle de l'IL-8 (Hartung et al., 1995; Mielcarek et al., 1998). Nous mettons également en évidence qu'il y a une diminution de la sécrétion de l'IL-10 alors qu'il est montré que le G-CSF augmente sa synthèse par les monocytes (Mielcarek et al., 1998; Fraser *et al.*, 2006) et les cellules T (Rutella *et al.*, 2002). Cette différence de résultats est certainement due à une différence de protocole d'activation des cellules ou de technique de détection des molécules. De plus, toutes les variations observées au niveau de la sécrétion de certaines cytokines sont de retour à la normale un mois après traitement.

Il a été démontré, grâce à une autre étude réalisée au sein du laboratoire, que le G-CSF augmente l'expression du marqueur CD45RO à la surface des cellules B (x 5) suggérant que le G-CSF active les cellules B (Tayebi et al., 2001). Nous avons mis en évidence une augmentation moindre de l'expression du CD45RO sur les lymphocytes B (x 3,4), mais nous confirmons également une augmentation du potentiel de sécrétion des IgG et IgM par les lymphocytes B stimulés par PWM *in vitro* (Morikawa *et al.*, 1993), et ceci est maintenu jusqu'à 6 mois après la mobilisation par G-CSF. Cette activation des cellules B pourrait entraîner une amélioration de la réponse humorale post transplantation. De plus, l'utilisation du G-CSF pourrait être bénéfique lors de protocole de ré-immunisation (Goldberg *et al.*, 2003; Machado, 2005).

Suite à un traitement par G-CSF, Nagler *et al* ont rapporté l'existence d'altérations génétiques et épigénétiques incluant des instabilités de l'ADN (Shapira *et al.*, 2003), un « timing » de réplication altéré et une augmentation du nombre d'aneuploïdie du chromosome 17 (Nagler et al., 2004). Les modifications observées au niveau du chromosome 17 semblent être irréversibles (Nagler et al., 2004). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au pourcentage de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17. Nous observons bien une

augmentation significative du nombre de cellules aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17, et ceci jusqu'à 6 mois après la mobilisation. Un an après mobilisation, les nombres de cellules aneuploïdes sont plus élevés que les valeurs de référence mais ne sont plus significativement différents. Ce retour à la normale pourrait être dû au remplacement des cellules aneuploïdes par des cellules jeunes et normales.

Deux hypothèses non exclusives concernant ces cellules aneuploïdes peuvent être émises :

- des cellules deviennent aneuploïdes lors de divisions, et ceci sous l'effet de la mobilisation par G-CSF
- ces cellules aneuploïdes pré-existent dans la moelle osseuse avant l'administration de G-CSF et passent dans le sang sous l'effet du G-CSF

Le fait que le pourcentage de cellules aneuploïdes retourne à des valeurs normales au bout d'un an peut être dû à la diminution du nombre de cellules anormales ou à l'augmentation du nombre des cellules normales présentes dans le sang. Ceci pourra être vérifié par des manipulations supplémentaires ultérieures. Il faudrait également s'assurer du type de cellules affectées par ces altérations génétiques et épigénétiques. En effet, il a été montré que des cellules myéloïdes circulant dans le sang de donneurs traités par G-CSF pouvaient être tétraploïdes (Kaplinsky *et al.*, 2003).

De plus, nous nous sommes intéressé aux cellules CD34+ utilisées dans les greffons, et nous avons montré que ces cellules CD34+ sont normales, les cellules aneuploïdes ne sont donc pas greffées aux malades. Aucune anomalie n'a pu être mise en évidence, les aneuploïdies sont retrouvées au niveau des cellules CD34-. Ceci est rassurant pour les patients greffés avec des CSP mobilisées par G-CSF, mais les conséquences possibles sur le donneur seront à étudier ultérieurement.

Au vu de ces résultats concernant les chromosomes 8 et 17, nous avons regardé si ces anomalies pouvaient toucher les autres chromosomes. Pour cela, nous avons réalisé des caryotypes sur des prélèvements P3 de quelques donneurs. Plus de 50 mitoses ont été analysées à chaque fois, ce qui aurait dû permettre d'observer environ cinq mitoses aneuploïdes pour les chromosomes 8 ou 17. De plus, nous aurions dû observer des anomalies caryotypiques sur l'un ou l'autre des 23 chromosomes en quantité importante. Or, les caryotypes n'ont montré que des mitoses normales. Les anomalies décrites auparavant au niveau des chromosomes 8 et 17 ne sont même pas retrouvées. Nous avons donc évoquées des

problèmes techniques lors d'une manipulation et pour éliminer cette hypothèse, nous avons réalisés de la FISH (8 et 17) sur ces mêmes lames. Aussi surprenant que cela parue, nous avons retrouvé des taux d'aneuploïdie élevé (comme trouvés lors de la première analyse), mais uniquement sur des noyaux. Tous les noyaux à l'état métaphasique sont normaux et des noyaux aneuploïdes ont été retrouvés uniquement dans la fraction non métaphasique.

Plusieurs hypothèses peuvent ainsi être émises pour trouver une explication compatible avec ces résultats. Chacune d'elle sera vérifiée ultérieurement afin de mieux comprendre les mécanismes de mobilisation par G-CSF:

- les cellules aneuploïdes ne sont pas capables de se diviser, ce qui expliquerait que leurs pourcentages diminuent avec le temps. De plus, ceci expliquerait que nous retrouvons les cellules aneuploïdes uniquement dans la fraction non métaphasique. Pour vérifier cela, il suffit de mettre en culture des cellules mononucléées isolées de prélèvements post G-CSF (P3 ou P4) en présence de CFSE et de PHA. Après cette culture, les cellules CFSE+ et CFSE- seront triées et chaque fraction sera étudiée en FISH. Ceci nous permettra de voir si nous retrouvons des noyaux aneuploïdes pour les chromosomes 8 et 17 uniquement parmi les cellules CFSE+ (qui ne se sont pas divisées).
- les cellules aneuploïdes sont capables de se diviser mais leur temps de division est différent de ceux des lymphocytes normaux, et ainsi, la synchronisation ne permet pas de mettre en évidence les noyaux métaphasiques des cellules anormales lors du caryotypage. Ceci pourra être vérifié en faisant varier le temps de culture avant réalisation du caryotypage.
- les aneuploïdies affectent d'autres chromosomes. Sur un prélèvement pré G-CSF (P1 ou P2) et sur un prélèvement post G-CSF (P3 ou P4), il faudra réaliser des analyses de FISH en utilisant d'autres sondes marquant par exemple les chromosomes 13, 18 et 21 afin de déterminer si les aneuploïdies sont spécifiques ou non des chromosomes 8 et 17.
- Les aneuploïdies ne sont pas induites directement par le G-CSF mais simplement par la sortie médullaire. Pour vérifier cela, plusieurs approches peuvent être envisagées. La première manipulation serait d'obtenir un prélèvement sanguin d'un patient en sortie d'aplasie, mécanisme imité par la mobilisation par G-CSF, et réaliser des analyses FISH. D'autre part, nous ne connaissons pas le pourcentage d'aneuploïdie dans la moelle osseuse. La deuxième manipulation à réaliser serait de comparer le pourcentage d'aneuploïdie dans la moelle osseuse non mobilisée (et



si possible mobilisée) afin de déterminer s'il y a à l'état basal plus de cellules aneuploïdes dans la moelle osseuse que dans le sang. Enfin, un modèle murin de mobilisation par G-CSF pourrait être mis au point afin de comparer les pourcentages d'aneuploïdie dans le sang et dans la moelle avant et après mobilisation. Un contrôle murin de traitement par chimiothérapie pourra être réalisé en parallèle.

- les aneuploïdies sont induites directement par le G-CSF qui module l'expression des gènes impliqués dans la ségrégation des chromosomes. Des analyses du transcriptome des cellules aneuploïdes triées pourrait être réalisées afin de mettre en évidence une modification de l'expression de certains gènes.
- l'aneuploïdie est un marqueur de sénescence. Afin de vérifier cette hypothèse, des PCR quantitative spécifique de facteurs de sénescence comme p16<sup>ink4a</sup> pourraient être réalisées sur les prélèvements pré G-CSF versus des prélèvements post G-CSF.

Ces différentes hypothèses seront vérifiées ultérieurement afin de mieux comprendre les mécanismes de la mobilisation par G-CSF.

La seconde étude clinico-biologique a pour but d'étudier la reconstitution immunitaire chez des patients greffés avec des CSP mobilisées par G-CSF. Cette reconstitution est complexe, et dépend de nombreux facteurs cliniques ou non tels que l'âge du donneur ou du patient, le diagnostic, le régime immunosuppresseur reçu, les éventuels infusions de lymphocytes du donneur, la survenue de GVH ou autre complications post transplantation...

Les lymphopénies CD3 ou CD4 post transplantation sont persistantes (au delà de 18 mois) et la numération des cellules CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> (cellules naïves) ainsi que celle des TREC sont faibles. La majorité des lymphocytes CD4<sup>+</sup> présents dans le sang de ces patients sont des cellules mémoires et des cellules intermédiaires, ceci suggérant que les cellules sont récemment activées ou issues d'une expansion périphérique des cellules T du donneur présents dans le greffon. D'autre part, les numérations des TREC diminuent entre 7,5 et 11 mois. Ce résultat est du, soit à la mort des cellules naïves TREC<sup>+</sup>, soit, plus probablement, à la division des cellules TREC<sup>-</sup> qui entraîne la dilution des cellules TREC<sup>+</sup>. Ce phénomène de

diminution des numérations des TREC a déjà été observé par Bahceci *et al* qui ont montré que c'était dû à une expansion des cellules T d'origine thymique (Bahceci *et al.*, 2003).

En revanche, les numérations cellulaires CD8<sup>+</sup> sont rapidement normalisées (6 mois) (Storek *et al.*, 2001; Mohty *et al.*, 2002) entraînant ainsi une inversion du ratio CD4 / CD8. La plupart des cellules CD8<sup>+</sup> ont un phénotype mémoire (CD27<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup>) ou effecteur (CD27<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup>), caractéristique d'une expansion clonale périphérique (Hamann *et al.*, 1999). D'autre part, l'expression des marqueurs CD57 et HLADR à la surface des cellules CD8<sup>+</sup> est rapidement normalisée (dès les premiers mois).

Les sous populations lymphocytaires B et NK retrouvent des numérations normales un an environ après la greffe. Nous observons que les cellules B CD19<sup>+</sup> reconstituent plus rapidement que les cellules T CD4<sup>+</sup>, contrairement à ce qui a déjà été montré par plusieurs équipes (Busca *et al.*, 2003; Maris *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2003). Les cellules NK et B sont impliquées dans le contrôle des infections virales et leur rapide reconstitution contribue à un effet protecteur contre les réactivations virales. En effet dans notre étude, nous ne mettons en évidence qu'un très faible pourcentage de survenue d'infections post transplantation. Ce faible pourcentage peut aussi venir du fait que notre étude est rétrospective et que la survenue d'infections n'a peut être pas été documentée dans les dossiers cliniques avant l'administration des traitements.

La reconstitution post greffe de CSP mobilisées par G-CSF a lieu par le mécanisme d'expansion périphérique des cellules T, compensant ainsi la lymphopoïèse dépendante du thymus. Cette expansion périphérique et la rapide reconstitution des cellules B et NK contribuent à limiter les infections sévères. Tous ces résultats sont bien sûr à confirmer sur une plus grande cohorte de patients et de façon prospectif afin d'avoir plus de renseignements cliniques.

En conclusion, nous pouvons dire que l'administration de G-CSF provoque des altérations immunologiques, cytogénétiques et fonctionnelles chez des donneurs sains. Bien que ces altérations soient toutes revenues à la normale un an après la mobilisation, certaines restent différentes pendant plusieurs mois (jusqu'à 6 mois). Aucune étude n'a mis en évidence un risque direct de transformation leucémique, mais un suivi systématique des donneurs sains volontaires de CSP devrait être réalisé.

Cependant la transplantation de CSP mobilisées par G-CSF semble avoir des intérêts conséquents pour le receveur. En effet, ce type de greffe favorise l'expansion périphérique des cellules T chez le patient et par conséquent, limite la survenue de GVH chronique et d'infections sévères post transplantation. La encore, des études comportant un plus grand nombre de patients devra confirmer ces données.



# **BIBLIOGRAPHIE**



- Ai, J., L. J. Druhan, et al. (2008). "G-CSFR ubiquitination critically regulates myeloid cell survival and proliferation." PLoS ONE **3**(10): e3422.
- Anderlini, P., F. A. Chan, et al. (2002). "Long-term follow-up of normal peripheral blood progenitor cell donors treated with filgrastim: no evidence of increased risk of leukemia development." Bone Marrow Transplant **30**(10): 661-3.
- Arpinati, M., C. L. Green, et al. (2000). "Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells." Blood **95**(8): 2484-90.
- Avalos, B. R. (1996). "Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." Blood **88**(3): 761-77.
- Bahceci, E., D. Epperson, et al. (2003). "Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease or mixed chimaerism." Br J Haematol **122**(6): 934-43.
- Bainton, D. F., J. L. Ulliyot, et al. (1971). "The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow." J Exp Med **134**(4): 907-34.
- Barnes, D. W. and J. F. Loutit (1957). "Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II." Br J Haematol **3**(3): 241-52.
- Bensinger, W. I., R. Clift, et al. (1996). "Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation." Blood **88**(7): 2794-800.
- Boneberg, E. M. and T. Hartung (2002). "Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1beta release via suppressed processing of proIL-1beta, whereas TNF-alpha release is inhibited on the level of proTNF-alpha formation." Eur J Immunol **32**(6): 1717-25.
- Bradley, T. R. and D. Metcalf (1966). "The growth of mouse bone marrow cells in vitro." Aust J Exp Biol Med Sci **44**(3): 287-99.
- Busca, A., E. Lovisone, et al. (2003). "Immune reconstitution and early infectious complications following nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation." Hematology **8**(5): 303-11.
- Carayol, G., J. H. Bourhis, et al. (1997). "Quantitative analysis of T helper 1, T helper 2, and inflammatory cytokine expression in patients after allogeneic bone marrow transplantation: relationship with the occurrence of acute graft-versus-host disease." Transplantation **63**(9): 1307-13.

- Cavallaro, A. M., K. Lilleby, et al. (2000). "Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." Bone Marrow Transplant **25**(1): 85-9.
- Chen, F., M. A. Maldonado, et al. (1998). "The role of host (endogenous) T cells in chronic graft-versus-host autoimmune disease." J Immunol **161**(11): 5880-5.
- de la Rubia, J., F. de Arriba, et al. (2008). "Follow-up of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection. Results of the Spanish Donor Registry." Haematologica **93**(5): 735-40.
- Donadieu, J., T. Leblanc, et al. (2005). "Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group." Haematologica **90**(1): 45-53.
- Dong, F., L. H. Hoefsloot, et al. (1994). "Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4480-4.
- Dreger, P., T. Haferlach, et al. (1994). "G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft." Br J Haematol **87**(3): 609-13.
- Dreger, P., K. Oberboster, et al. (1996). "PBPC grafts from healthy donors: analysis of CD34+ and CD3+ subpopulations." Bone Marrow Transplant **17 Suppl 2**: S22-7.
- Fearnley, D. B., L. F. Whyte, et al. (1999). "Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation." Blood **93**(2): 728-36.
- Ferrara, J. L., K. R. Cooke, et al. (1996). "The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease." Stem Cells **14**(5): 473-89.
- Fraser, A. R., G. Cook, et al. (2006). "Immature monocytes from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell collections carry surface-bound IL-10 and have the potential to modulate alloreactivity." J Leukoc Biol **80**(4): 862-9.
- Glass, B., L. Uharek, et al. (1997). "Allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation in a murine model: evidence for an improved graft-versus-leukemia effect." Blood **90**(4): 1694-700.
- Gluckman, E., H. A. Broxmeyer, et al. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**(17): 1174-8.



- Goldberg, S. L., C. E. Cicogna, et al. (2003). "Vaccinations against infectious diseases in hematopoietic stem cell transplant recipients." Oncology (Williston Park) **17**(4): 539-54, 559; discussion 559-60, 564-5.
- Gorgen, I., T. Hartung, et al. (1992). "Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha." J Immunol **149**(3): 918-24.
- Hamann, D., S. Kostense, et al. (1999). "Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division." Int Immunol **11**(7): 1027-33.
- Hartung, T. (1999). "Anti-inflammatory aspects of Filgrastim and impact on IL-2 release." J Hematother Stem Cell Res **8 Suppl 1**: S21-2.
- Hartung, T., W. D. Doecke, et al. (1995). "Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers." Blood **85**(9): 2482-9.
- Hartung, T., W. D. Doecke, et al. (1999). "Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions." Clin Pharmacol Ther **66**(4): 415-24.
- Hasenclever, D. and M. Sextro (1996). "Safety of AlloPBPC donors: biometrical considerations on monitoring long term risks." Bone Marrow Transplant **17 Suppl 2**: S28-30.
- Heldal, D., L. Brinch, et al. (2002). "Donation of stem cells from blood or bone marrow: results of a randomised study of safety and complaints." Bone Marrow Transplant **29**(6): 479-86.
- Hernandez, J. M., C. Castilla, et al. (2005). "Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes." Leukemia **19**(6): 1088-91.
- Kaplinsky, C., L. Trakhtenbrot, et al. (2003). "Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF." Bone Marrow Transplant **32**(1): 31-4.
- Keung, Y. K., S. Suwanvecho, et al. (1999). "Anaphylactoid reaction to granulocyte colony-stimulating factor used in mobilization of peripheral blood stem cell." Bone Marrow Transplant **23**(2): 200-1.
- Korbling, M., P. Anderlini, et al. (1996). "Delayed effects of rhG-CSF mobilization treatment and apheresis on circulating CD34+ and CD34+ Thy-1dim CD38- progenitor cells, and lymphoid subsets in normal stem cell donors for allogeneic transplantation." Bone Marrow Transplant **18**(6): 1073-9.

- Korbling, M., Y. O. Huh, et al. (1995). "Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease." Blood **86**(7): 2842-8.
- Koury, M. J. and P. Ponka (2004). "New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron." Annu Rev Nutr **24**: 105-31.
- Lapierre, V., A. Auperin, et al. (2002). "Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation." Blood **100**(4): 1484-9.
- Lapierre, V., M. Kuentz, et al. (2000). "Allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation: guidelines for red blood cell immuno-hematological assessment and transfusion practice. Societe Francaise de Greffe de Moelle." Bone Marrow Transplant **25**(5): 507-12.
- Lapierre, V., N. Oubouzar, et al. (2001). "Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogeneic transplantation." Blood **97**(9): 2580-6.
- Layton, J. E. and N. E. Hall (2006). "The interaction of G-CSF with its receptor." Front Biosci **11**: 3181-9.
- Le Berre, C. (2005). "[Haematopoietic stem cell specimens]." Transfus Clin Biol **12**(2): 160-2.
- Machado, C. M. (2005). "Reimmunization after hematopoietic stem cell transplantation." Expert Rev Vaccines **4**(2): 219-28.
- Majolino, I., G. Saglio, et al. (1996). "High incidence of chronic GVHD after primary allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies." Bone Marrow Transplant **17**(4): 555-60.
- Maris, M., M. Boeckh, et al. (2003). "Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning." Exp Hematol **31**(10): 941-52.
- Martinez, C., A. Urbano-Ispizua, et al. (1996). "Granulocyte colony-stimulating factor administration and peripheral blood progenitor cells collection in normal donors: analysis of leukapheresis-related side effects." Blood **87**(11): 4916-7.
- Martinez, C., A. Urbano-Ispizua, et al. (1996). "Effects of G-CSF administration and peripheral blood progenitor cell collection in 20 healthy donors." Ann Hematol **72**(4): 269-72.

- Mielcarek, M., L. Graf, et al. (1998). "Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation." Blood **92**(1): 215-22.
- Mohty, M., B. Gaugler, et al. (2002). "Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation." Hematology **7**(3): 157-64.
- Morikawa, K., T. Miyawaki, et al. (1993). "G-CSF enhances the immunoglobulin generation rather than the proliferation of human B lymphocytes." Eur J Haematol **51**(3): 144-51.
- Nagata, S., M. Tsuchiya, et al. (1986). "The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor." Embo J **5**(3): 575-81.
- Nagler, A., A. Korenstein-Ilan, et al. (2004). "Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells." Exp Hematol **32**(1): 122-30.
- Nardi, N. B. and Z. Z. Alfonso (1999). "The hematopoietic stroma." Braz J Med Biol Res **32**(5): 601-9.
- Nawa, Y., T. Teshima, et al. (2000). "G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function." Bone Marrow Transplant **25**(10): 1035-40.
- Ordemann, R., K. Holig, et al. (1998). "Acceptance and feasibility of peripheral stem cell mobilisation compared to bone marrow collection from healthy unrelated donors." Bone Marrow Transplant **21 Suppl 3**: S25-8.
- Ottinger, H. D., D. W. Beelen, et al. (1996). "Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow." Blood **88**(7): 2775-9.
- Parkman, R. (1998). "Chronic graft-versus-host disease." Curr Opin Hematol **5**(1): 22-5.
- Pelus, L. M., H. Bian, et al. (2004). "Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4." Blood **103**(1): 110-9.
- Petersen, S. L., L. P. Ryder, et al. (2003). "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 **32**(1): 65-72.

- Przepiorka, D., T. L. Smith, et al. (2001). "Controlled trial of filgrastim for acceleration of neutrophil recovery after allogeneic blood stem cell transplantation from human leukocyte antigen-matched related donors." Blood **97**(11): 3405-10.
- Ratanatharathorn, V., L. Ayash, et al. (2003). "Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody." Biol Blood Marrow Transplant **9**(8): 505-11.
- Reyes, E., I. Garcia-Castro, et al. (1999). "Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) transiently suppresses mitogen-stimulated T-cell proliferative response." Br J Cancer **80**(1-2): 229-35.
- Rondelli, D., D. Raspadori, et al. (1998). "Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells." Bone Marrow Transplant **22**(7): 631-7.
- Rozendaal, L., S. T. Pals, et al. (1990). "Persistence of allospecific helper T cells is required for maintaining autoantibody formation in lupus-like graft-versus-host disease." Clin Exp Immunol **82**(3): 527-32.
- Russell, J. A., C. Brown, et al. (1996). "Allogeneic blood cell transplants for haematological malignancy: preliminary comparison of outcomes with bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **17**(5): 703-8.
- Rutella, S., L. Pierelli, et al. (2002). "Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells." Blood **100**(7): 2562-71.
- Shapira, M. Y., P. Kaspler, et al. (2003). "Granulocyte colony stimulating factor does not induce long-term DNA instability in healthy peripheral blood stem cell donors." Am J Hematol **73**(1): 33-6.
- Sica, S., S. Rutella, et al. (1996). "rhG-CSF in healthy donors: mobilization of peripheral hemopoietic progenitors and effect on peripheral blood leukocytes." J Hematother **5**(4): 391-7.
- Singh, R. K., K. Ino, et al. (1999). "Immunoregulatory cytokines in bone marrow and peripheral blood stem cell products." Bone Marrow Transplant **23**(1): 53-62.
- Sloand, E. M., S. Kim, et al. (2000). "Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo." Blood **95**(7): 2269-74.
- Sprent, J., M. Schaefer, et al. (1990). "Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease (GVHD) directed to class I versus class II H-2 differences. II. Protective effects of L3T4+ cells in anti-class II GVHD." J Immunol **144**(8): 2946-54.

- Storek, J., M. A. Dawson, et al. (2000). "Normal T, B, and NK cell counts in healthy donors at 1 year after blood stem cell harvesting." Blood **95**(9): 2993-4.
- Storek, J., M. A. Dawson, et al. (2001). "Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation." Blood **97**(11): 3380-9.
- Storek, J., T. Gooley, et al. (1997). "Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts." Am J Hematol **54**(2): 131-8.
- Stroncek, D. F., M. E. Clay, et al. (1997). "Blood counts in healthy donors 1 year after the collection of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized progenitor cells and the results of a second mobilization and collection." Transfusion **37**(3): 304-8.
- Talmadge, J. E., E. Reed, et al. (1997). "Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow." Bone Marrow Transplant **19**(2): 161-72.
- Tassi, C., P. L. Tazzari, et al. (2005). "Short- and long-term haematological surveillance of healthy donors of allogeneic peripheral haematopoietic progenitors mobilized with G-CSF: a single institution prospective study." Bone Marrow Transplant **36**(4): 289-94.
- Tayebi, H., F. Kuttler, et al. (2001). "Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells." Exp Hematol **29**(4): 458-70.
- Tayebi, H., V. Lapierre, et al. (2001). "Enhanced activation of B cells in a granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cell graft." Br J Haematol **114**(3): 698-700.
- Terstappen, L. W., S. Huang, et al. (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-27.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., et al. (1957). "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy." N Engl J Med **257**(11): 491-6.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-22.
- Urbano-Ispizua, A., C. Rozman, et al. (1997). "Rapid engraftment without significant graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood." Blood **89**(11): 3967-73.

- Weaver, C. H., R. A. Clift, et al. (1994). "Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on relapse in patients transplanted for acute myeloid leukemia." Bone Marrow Transplant **14**(6): 885-93.
- Zeng, D., S. Dejbakhsh-Jones, et al. (1997). "Granulocyte colony-stimulating factor reduces the capacity of blood mononuclear cells to induce graft-versus-host disease: impact on blood progenitor cell transplantation." Blood **90**(1): 453-63.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

# **ANNEXES**





## **Transient immunological and cytogenetic perturbations after G-CSF mobilization in normal peripheral blood stem cell donors**

Caroline Marmier-Savet<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Fabrice Larosa<sup>1, 5</sup>, Eric Deconinck<sup>1, 5</sup>, Suzanne Mathieu-Nafissi<sup>6</sup>, Faezeh Legrand<sup>5</sup>, Brigitte Witz<sup>7</sup>, Caroline Bonmati<sup>7</sup>, Dana Ranta<sup>7</sup>, Maribel Tavernier<sup>3</sup>, Mauricette Michallet<sup>8</sup>, Pascale Louvat<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Marc Puyraveau<sup>4</sup>, Nicole Raus<sup>8</sup>, Olivier Hequet<sup>9</sup>, Marie-Agnès Collonge Rame<sup>10</sup>, Fabienne Pouthier<sup>3</sup>, Jean-Luc Bresson<sup>10</sup>, Pierre Tiberghien<sup>1, 2, 3</sup>, Eric Robinet<sup>1, 2, 3, \*</sup>

1 INSERM, U645, 25020 Besançon, France,

2 Université de Franche-Comte, IFR133, 25020 Besançon, France,

3 Etablissement Français du Sang, Bourgogne/Franche-Comté, 25020 Besançon, France,

4 Centre d'Investigation Clinique en Biothérapies, 25020 Besançon, France,

5 University Hospital Besançon, Hematology Department, 25020 Besançon, France

6 Etablissement Français du Sang, Lorraine/Champagne, 54511 Vandoeuvre, France

7 University Hospital Nancy, Hematology Department, 54000 Nancy, France,

8 University Hospital Lyon, Hematology Department, 69000 Lyon, France

9 Etablissement Français du Sang, Rhône-Alpes, 69000 Lyon, France

10 University Hospital Besançon, Cytogenetic Department, 25020 Besançon, France

\* Present address : INSERM, U748, 67000 Strasbourg, France

*Correspondence to* : Eric Robinet, PhD,

INSERM U748, 3 rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

Tel : (33) 390 24 37 09      Fax : (33) 390 24 37 24

E-mail : [eric.robinet@viro-ulp.u-strasbg.fr](mailto:eric.robinet@viro-ulp.u-strasbg.fr)

## **Abstract**

The short-term immunological effects of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) have been extensively studied, but concerns regarding its long-term safety have been raised by recent reports of G-CSF-induced genetic perturbations. Therefore, we performed a prospective study to observe the immunologic and cytogenetic alterations induced by G-CSF mobilization in a cohort of 24 healthy donors. Blood samples were taken before G-CSF administration, at the time of administration, and at one, three, six, and twelve months. Platelet, granulocyte, monocyte, B and dendritic blood cell counts as well as the Interleukin(IL)-2, -8 and -10 secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC), perturbed at the time of G-CSF mobilization, were found to return to baseline values at one month with T-cell and NK-cell counts recovering at three months. *In vitro* immunoglobulin G and M production by PBMC was found to be increased up to 6 months after mobilization. Quite strikingly, G-CSF mobilization was also associated with increased PBMC aneuploidy restricted to CD34- cells that lasted more than 6 months. However, karyotype analysis was normal at time of mobilization. Although assessment of the potential long-term risk of G-CSF administration will require prolonged observation of larger G-CSF-mobilized donor cohorts, our data show that the duration of immunological and cytogenetic perturbations may be more persistent than previously described. Such perturbations remain however transient with a return to baseline values within one year for most perturbations.

## Introduction

The mobilization of allogeneic peripheral blood stem cells (PBSC) by the administration of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in healthy sibling or unrelated donors is being considered as an alternative approach to bone marrow transplantation (BMT). This method supports a rapid and durable engraftment, with both neutrophil and platelet reconstitution. Previous studies have found that PBSC harvests contain approximately 10-fold more T cells than bone marrow (BM) harvests<sup>1,2</sup>. It has also been shown that G-CSF mobilization has qualitative effects on T-cell function<sup>3</sup>. Numerous studies have reported that G-CSF reduces the ability of T cells and natural killer (NK) cells to proliferate, differentiate into effector cytotoxic or helper cells in response to interleukin-2 (IL-2), mitogens, or alloantigens<sup>4-15</sup>, and secrete inflammatory type 1 cytokines such as interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and IL-2<sup>15-21</sup>. On the other hand, G-CSF has been found to increase the production of anti-inflammatory type 2 cytokines<sup>15,22-25</sup>, although its effects on IL-4 production remain controversial<sup>6,12,23,26,27</sup>. There are three cell types primarily involved in mediating the suppression or deviation of T-cell functions: suppressive, or regulatory, T cells<sup>28</sup>; monocytes<sup>20,22,29</sup>; and type 2 dendritic cells (DC)<sup>30,31</sup>. Few studies have addressed the effects of G-CSF mobilization on B-cell function, but it has been shown that G-CSF administration is associated with increased B-cell activation, as shown by the increased expression of activation markers<sup>32</sup>, enhanced *in vitro* immunoglobulin (Ig) secretion<sup>33</sup>, and higher incidences of anti-HLA<sup>34</sup> and anti-ABO<sup>35</sup> immunization after PBSC transplant compared to BMT.

Despite extensive study of the short-term immunological effects of G-CSF, the long-term effects on the immune cell functions of healthy donors are largely unknown. Concerns regarding the safety of G-CSF administration have been raised<sup>36</sup>, particularly in relation to oncogenic potential. An increased risk of acute myelogenous leukemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS) after G-CSF treatment has been reported in breast cancer patients<sup>37</sup> and patients with severe chronic neutropenia (for a review, see Tigue et al.)<sup>38</sup>. Although some cases of AML or solid cancers reported in normal donors occurred late after G-CSF mobilization, single-site studies have not described late effects associated with G-CSF therapy<sup>38,36,39-43</sup>. However, the size of studied cohorts and/or the duration of follow-up may be insufficient to answer the question about long-term effects. In fact, it has been calculated that a cohort of more than 10 000 healthy G-CSF-mobilized donors should be followed-up for at least 10 years in order to observe a 0.5% incidence of leukemia<sup>44</sup>.

Nagler et al<sup>45</sup> recently reported that lymphocytes from G-CSF-mobilized donors display epigenetic and genetic alterations, altered replication timing of alleles and aneuloidy, respectively, similar to those observed in the lymphocytes of leukemia patients. Although the observed loss of replication synchrony returned to baseline levels five to nine months after G-CSF administration, aneuploidy was still seen up to nine months after mobilization. Furthermore, tetraploid myeloid cells have been found by others<sup>46</sup> to be associated with G-CSF treatment in PBSC donors.

To further evaluate the scope and duration of G-CSF-induced immunologic and genetic alterations in PBMC of normal donors, we performed and report here a study involving a one-year biological follow-up of a cohort of 24 healthy G-CSF-mobilized donors recruited in three transplantation centers.

## **Patients, materials, and methods**

### **Study design**

The study involved donors recruited in three transplantation centers (Besançon, Nancy, and Lyon, France) and was approved by the ethical committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Besançon) in October 2004. For each donor, eight blood collections were performed, the first two serving as reference samples. The first blood sample (S1) was taken approximately one month prior to G-CSF administration when written informed consent was obtained. The second blood sample (S2) was taken the day of the first G-CSF infusion, before infusion. Six blood samples were taken after G-CSF administration: after the last infusion, but before beginning cytapheresis (S3, n = 24), after cytapheresis was completed (S4, n = 23), one month (S5, n = 24), three months (S6, n = 24), six months (S7, n = 22) and twelve months (S8, n = 18) after cytapheresis began. Data was recorded independently by two investigators (CMS & PL) in two Access databases (Microsoft, Courtaboeuf, France). The databases were merged to identify and correct errors of data capture before statistical analysis.

### **Peripheral blood stem cell donors**

Donors were eligible for hematopoietic stem cell (HSC) collection if they were at least 18 years old, HIV-seronegative, exhibited no contraindication for PBSC harvest, and had no known allergy to G-CSF. Each donor gave his or her written informed consent. Donors were administered glycosylated G-CSF (Granocyte®, Lenograstim, Chugai Pharma, Paris, France; n=6) or non-glycosylated G-CSF (Neupogen® (Filgrastim, Amgen, Neuilly sur seine, France; n=17) 5 µg/kg twice daily for 5 days. Peripheral blood cells were then collected in one to three cytapheresis procedures until the obtention of at least  $4 \times 10^6$  CD34+ cells/kg.

Seven 6 mL-blood tubes were drawn at each sampling: one tube of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-anticoagulated blood was used for RNA extraction and blood cell counts, one tube of coagulated blood was used for serum collection, and five tubes of heparin-anticoagulated blood were centrifuged over Ficoll layer (GE Healthcare, Saclay, France) according to manufacturer's protocol in order to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for the different analyses. The remaining unused cells were cryopreserved in liquid nitrogen for further biological analysis.

### **Blood cell counts**

Blood cell counts and blood parameters (hemoglobin, hematocrit) were performed with an XE 9100 cell counter (Sysmex France, Roissy, France) on all EDTA-anticoagulated blood samples. Blood cell counts were used to calculate cell counts of different subsets cells in combination with data obtained by flow cytometry.

### **Flow cytometry analysis of cell surface markers**

Lymphocyte subset frequencies were analyzed by direct immunostaining of fresh PBMC. Four or five-color staining was performed with monoclonal antibodies (mAb) purchased from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France): PerCP-CD3, APC-CD4, PECy7-CD19, FITC-CD45RA, PE-CD45RO; PerCP-CD3, FITC-CD4, PE-CD8, PECy7-antiHLADR, APC-CD95; FITC-CD3, PerCP-CD4, PECy7-CD25, APC-CD18, PE-CD49b; and FITC-Lin, PerCP-anti-HLADR, APC-CD11c, PE-CD123. Antibodies were incubated with PBMC ( $5 \times 10^5$  cells) for 20 minutes at 4°C. After washing in phosphate buffer solution (PBS) supplemented with 1% v/v fetal calf serum (FCS, Gibco, Cergy Pontoise, France), cells were fixed with PBS supplemented with 2% v/v formaldehyde (Sigma Aldrich, Lyon, France) and analyzed by flow cytometry with a Cyan ADP (Dako-Cytomation, Trappes, France). A minimum of 10 000 events were analyzed in the lymphocyte size and structure gate. Frequencies were multiplied by absolute blood lymphocyte counts in order to calculate blood counts of each lymphocyte subset.

### **Cytokine quantification**

One million PBMC were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% AB serum (EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France) and phytohemagglutinin (PHA) (10 µg/mL, Sigma) for 24 or 72 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell-culture supernatants were centrifuged for five minutes at 300g and were cryopreserved at -20°C until cytokine quantification. Multiplex quantification of ten cytokines (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, and TNF-α) was performed with a Luminex Athena Multi Lyte™ (Luminex Corporation, Austin, USA) on 25 µL of supernatant using the human cytokine lincoplex kit (Linco, Billerica, USA) according to the manufacturer's recommendations. All samples were incubated with detection beads corresponding to the different cytokines of interest. Visualization was done using the streptavidin-phycoerythrin system.

### **Immunoglobulin quantification**

One million PBMC were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and pokeweed mitogen (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma) for 14 days at 37°C and a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Supernatants were then obtained as previously described and cryopreserved at -20°C until human IgG and IgM quantification using ELISA kits (Bethyl, Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's recommendations. Capture antibody was briefly coated and each well was blocked before transfer of samples, standards, and controls. The ELISA was conjugated with the horseradish peroxidase (HRP) system and the plate was read at 450 nm. The background was obtained by immunoglobulin quantification in a control containing RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. The quantification was performed in duplicate and the background was subtracted from each value.

### **Cytogenetic analysis**

#### Sample preparation

Six hundred fifty  $\mu\text{L}$  (or 300  $\mu\text{L}$  for S3 and S4) of heparin-anticoagulated blood were mixed with 6.75 mL of RPMI 1640 (Gibco), 1.75 mL of FCS (Gibco), 20  $\mu\text{L}$  of penicillin and streptomycin (Cambrex), and 125  $\mu\text{L}$  of PHA (Oxoid, Dardilly, France) for 72 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> environment. After centrifugation for ten minute at 300g, the cell-culture supernatant was discarded and the pellet was treated with a prewarmed hypotonic solution (37°C, 0.56% KCl) and placed at 37°C for 20 minutes. The nuclei pellet was fixed twice with a 3:1 methanol and glacial acetic acid solution at room temperature for 10 minutes. The supernatant was replaced by 1 mL of the fixing solution. The tube could be preserved at -20°C for several months. For two donors, D21 and D22, PBMC were isolated from S3 samples by centrifugation with Ficoll, then CD34<sup>+</sup> cells were purified to 96% and 89%, respectively, by positive immunomagnetic sorting (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's recommendations. The CD34<sup>+</sup> fraction was either analyzed immediately or incubated in 200  $\mu\text{L}$  of Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) in the presence of 20% FCS, 1% essential amino acid, the hemopoietic growth factors Fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L; 300 ng/mL), Stem Cell Factor (SCF; 300 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), and G-CSF (50 ng/mL) for 7 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> environment before hybridization. The CD34<sup>-</sup> fraction was either analyzed immediately or stimulated by PHA as indicated above, in parallel with the PBMC fraction, before hybridization.

#### Hybridization with DNA probes

Before hybridization, glass slides were placed in 100% ethanol for 2 minutes. The nuclei fixing solution was then layered on a slide. Ten  $\mu\text{L}$  of a probe mixture containing 1  $\mu\text{L}$  of each directly-labelled alpha satellite probe for human chromosome 8 (spectrum orange CEP 8 Z2 p11.1 – q11.1) and chromosome 17 (spectrum green CEP 17 Z1 p11.1 – q11.1) (Abbott-Vysis, Rungis, France) 7  $\mu\text{L}$  of hybridization buffer (Abbott-Vysis), and 1  $\mu\text{L}$  of water was dropped on the slide, covered by a coverslip, and sealed with rubber cement. The choice of studying chromosome 8 and 17 was based on probe availability as well as the wish to compare our findings with previously published data involving chromosomes 8 and 17<sup>45,46</sup>. Probes and nuclear DNA were co-denatured at 73°C for 1 minute and the hybridization was performed at 37°C overnight in a humid atmosphere in a Hybrite system (Abbott-Vysis). After incubation, the coverslips were removed and the slide was washed successively in a coplin jar containing 0.4x SSC (pH = 6.8) at 73 °C for 40 seconds, then in 2x SSC and 0.05% Tween 20 (pH = 7) at room temperature for 10 seconds. The slide was then air-dried in the dark, counterstained with DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) (Roche Diagnostics, Meylan, France) diluted in anti-fading vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA), and covered with a coverslip.

#### Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis

Microscopic evaluation was performed using the Axiophot epifluorescence microscope (Zeiss, Le Pecq, France) with an excitation filter set specifically for spectrum orange (83570, Vysis), spectrum green (83490, Vysis), and DAPI (83360, Vysis). Images were treated with the Cytovision software (Applied Imaging, San Jose, USA). For each probe, 500 nuclei were examined and the number presenting 1 (monosomy), 2, 3 (trisomy), or more (multisomy) hybridization signals was recorded. Multisomy was defined by the presence of two (tetrasomy) or more extra chromosomes of one type in an otherwise diploid cell. Frequencies of monosomic, trisomic, and multisomic cells were calculated.

#### Caryotyping

Blood samples were stimulated for 72 hours as described above, then cells were synchronised by 200  $\mu\text{l}$  synchronising solution (22 ml of FrdU  $10^{-5}$  M and 88 ml of uridin  $10^{-4}$  M) 24 hours before end of the culture. Seven hours before end of the culture, 160  $\mu\text{l}$  of thymidin  $10^{-3}$  M were additionned, and 3 hours before end of the culture, cells were bloqued with 200  $\mu\text{l}$  of vinblastin (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ).

Cells were treated as for FISH analysis (prewarmed hypotonic solution...).



Banding G of chromosome was realised with Giemsa and trypsin, and banding R with Giemsa and hot solution.

Slides were analysed with microscope, 50 metaphasic nuclei were counted and classed.

### **Statistical analysis**

For each biological parameter the S1 and S2 values, which are supposed to be identical, were compared with a paired student's t-test. If, for a given biological parameter, a significant difference was observed between the two series of values  $S1_{D1 \rightarrow D24}$  and  $S2_{D1 \rightarrow D24}$ , this parameter was not analyzed further and was excluded from the study.

The mean of the S1 and S2 values of a given biological parameter was used as the baseline value (BV). For each time point after G-CSF administration (S3 to S8), the value V obtained with a sample S for a donor D ( $V_{SD}$ ) was compared with its respective BV ( $BV_D$ ) using a paired student's t-test in order to determine statistically significant differences.

To estimate the confidence that can be attributed to biological variations observed after G-CSF-mobilization, we evaluated the normal fluctuation within time of each biological parameter before G-CSF administration by calculating the intra-individual variability of the baselines. The mean of the variation coefficient (%VC) for the  $BV_D$  of the 24 donors was calculated according to the equation  $\%VC = [\sum_{D1 \rightarrow D24} (SE_{BV_D}/BV_D)/24] \times 100$ , where  $SE_{BV_D}$  is the standard error of  $BV_D$ .

For each time point after G-CSF mobilization, the mean variation of the parameter compared with baseline was calculated according to the equation  $\% \Delta_{Sn} = [\sum_{D1 \rightarrow Dn} (1-(V_{SD}/BV_D))/n] \times 100$ , where n is the number of donors.

The variation of a given biological parameter after G-CSF mobilization was then considered to be biologically significant if  $V_{SD}$  was statistically different from  $BV_D$  and if the magnitude of variation ( $\% \Delta_{Sn}$ ) was greater than the magnitude of normal fluctuation (%VC).

## Results

### Description of donors

Twenty-four donors (9 males, 15 females, mean age:  $44.2 \pm 2.5$  years [range: 23.3-57.9]) were analyzed at a follow-up of three ( $n = 24$ ), six ( $n = 22$ ), and 12 ( $n = 18$ ) months. All donors had been treated with G-CSF and were donating HSC for the first time. After mobilization, twelve donors underwent cytapheresis once, ten donors underwent cytapheresis twice, one donor had cytaphereses three times, and one donor (D2) had no cytapheresis because of CD34 cell-mobilization failure despite 11 G-CSF infusions. This donor finally had bone marrow harvested. Having undergone G-CSF mobilisation as scheduled, D2 was not excluded from the study.

### Blood cell count changes

In accordance with previous reports<sup>42</sup>, platelet counts were slightly ( $91.3 \pm 4.8\%$  of BV), but significantly ( $P = .017$ ), decreased after G-CSF mobilization (S3) (Figure 1A). Donor D2 was found to have a drastic drop in the number of platelets after G-CSF mobilization ( $44 \times 10^9$  platelets/L) representing 22.6% of his  $BV_D$ , while the platelet counts of the other donors represented 62.7% to 146.9% of their  $BV_D$ . As expected from previous studies<sup>47-49</sup>, platelet counts in the donor cohort were even more decreased after cytapheresis (Figure 1A) and recovered to BV one month later, in donor D2 as well. The platelet count was less than  $100 \times 10^9$ /L in 3 out of the 24 donors at one month and in 1 donor out of the 24 at three months, but no donors had less than  $100 \times 10^9$  platelets/L at later time points.

The hemoglobin level (Figure 1B) and the hematocrit significantly dropped from  $14.4 \pm 0.3$  g/dL and  $44 \pm 1.1\%$  at BV to  $12.6 \pm 0.4$  g/dL ( $P < 10^{-5}$ ) and  $39.8 \pm 1.5\%$  ( $P = .00054$ ), respectively, after cytapheresis and recovered to BV by one month post-mobilization, similar to what was found in previous studies<sup>47,48,50</sup>.

White blood cell, polymorphonuclear (PMN) cell, and monocyte counts were significantly ( $P < 10^{-5}$ ) increased after G-CSF mobilization and after the last cytapheresis procedure, but recovered to BV by one month (Figure 1C-E) as expected from earlier reports<sup>48-50</sup>. Also in agreement with previous reports<sup>47-50</sup>, lymphocyte counts increased after G-CSF mobilization and slightly, but significantly ( $P = 0.0001$ ), decreased at one month after cytapheresis compared to BV ( $80.5 \pm 4.3\%$  of BV; range: 47.8-122.6% of BV). However, at three months the lymphocyte counts had returned to BV (Figure 1F).

Neutropenia (less than  $1.5 \times 10^9$  PMN/L) was not observed in any of the donors. Lymphopenia (less than  $1.0 \times 10^9$  lymphocytes/L) persisting up to 6 months after mobilization was observed in only one donor (D6) for six months.

The blood counts of donor D2 behaved similarly to the other donors, except the monocyte count which was found to have an increased post-G-CSF value equivalent to 143.2% of his  $BV_D$ , but less compared with  $685.7 \pm 57.8\%$  of BV (range: 150.0-1155.6%) for the 23 other donors. The monocyte counts of D2, who did not have cytapheresis after G-CSF mobilization, represented 54.6%, 50.0%, 65.6%, and 90.9% of his  $BV_D$  at one, three, six, and twelve months post-mobilization, respectively.

### **Lymphoid and dendritic cell subsets**

Flow cytometry allowed a more detailed study of lymphocyte and DC subsets.  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T-cell counts did not change after G-CSF mobilization and they were significantly ( $P = 0.0003$  and  $0.0036$ , respectively) decreased after cytapheresis. This decrease persisted for up to 12 and six months for  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T-cell counts, respectively (Figure 2A).  $CD3^- CD8^+$  NK-cell counts tended to be increased after G-CSF mobilization and were significantly decreased after cytapheresis ( $P = 0.0008$ ) for up to six months (Figure 2B). By contrast,  $CD3^- CD19^+$  B-cell counts were significantly increased after G-CSF mobilization ( $P = 0.0064$ ), but normalized after cytapheresis and remained similar to BV at later time points (Figure 2C).

Since G-CSF had been demonstrated to induce type 1 regulatory T (Tr1) cells<sup>28</sup>, possibly through the induction of tolerogenic DC<sup>31,51</sup>, we analyzed the blood count of Tr1 cells with a  $CD4^+ CD25^+ CD18^+ CD49b^+$  phenotype<sup>52</sup>. The number of Tr1 cells was significantly decreased at the time of G-CSF mobilization ( $P = 0.0012$ ) and cytapheresis ( $P = 0.0004$ ), but recovered to BV one month later (Figure 2D). By contrast,  $lin^- HLA-DR^+$  DC counts were noticeably increased after G-CSF mobilization and recovered to normal levels by one month (Figure 2E). In agreement with previous studies<sup>30,53</sup>, we found that  $CD123^+ CD11c^-$  plasmacytoid DC (PDC) were preferentially mobilized over  $CD123^- CD11c^+$  monocyte-derived dendritic cells (MoDC) (Figure 2F), but the PDC to MoDC ratio also recovered to BV by one month.

### **Cytokine production**

In order to assess the duration of G-CSF-induced modification of cytokine production, the potential was evaluated using a multiplex method which allowed for the simultaneous detection of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$ , and IFN-

$\gamma$ ) in the supernatant of PBMC stimulated with PHA for 24 or 72 hours. The intra-individual variability in cytokine production was usually high, making it difficult to interpret the results for most cytokines. Post-mobilization variations in cytokine production were in the same range or lower than the variations observed between S1 and S2. However, IL-2 and IL-10 production was significantly ( $P = 0.00011$  and  $0.00008$ , respectively) decreased (Figure 3A-B) and production of IL-8, which plays a major role in HSC mobilization<sup>54</sup>, was significantly ( $P = 0.0012$ ) increased (Figure 3C) after mobilization. The levels of all three cytokines returned to BV by one month.

### **Immunoglobulin secretion**

We previously reported an increased expression of CD45RO on B-cells after G-CSF mobilization in healthy donors<sup>32</sup> and higher incidences of anti-HLA<sup>34</sup> and anti-ABO<sup>35</sup> immunization after PBCST compared with BMT, suggesting that G-CSF mobilization could prime B cells. Consistent with our previous observation we found, using *in vitro* pokeweed mitogen (PWM) stimulation of PBMC, that G-CSF mobilization significantly ( $P < 10^{-5}$ ) increases the potential for IgG and IgM production. The Ig production levels decreased progressively thereafter, but remained significantly higher than BV for at least six months (Figure 4).

### **Cytogenetic analysis**

Nagler et al<sup>45</sup> recently reported that G-CSF mobilization is associated with an increased monosomy and multिसomy of chromosome 17. We confirm and expand such findings (Figure 5A-E). The percent aneuploidy of chromosomes 8 and 17 increased an average of 4.5 and 4.3-fold, respectively, after G-CSF mobilization (Figure 6A). Cells with multिसomy 8 and 17, rare events before mobilization (recorded at low levels in 4 and 5 donors, respectively), were observed at significantly higher frequencies in all 24 donors after mobilization. On the other hand, monosomic and trisomic cells were detectable at baseline in all donors although at low frequencies which increased significantly after mobilization. The level of aneuploidy of chromosomes 8 and 17 subsequently decreased after G-CSF mobilization, but remained significantly ( $P = 0.00003$  and  $0.0032$ , respectively) higher than BV at three and six months after mobilization (Figure 6A). The frequency of cells with monosomy was higher, and returned to BV more gradually, than the percent of cells with trisomy or multिसomy (Figures 6B-C).

To investigate whether such cytogenetic abnormalities affected CD34<sup>+</sup> cells and whether such abnormalities required the induction of cell division, CD34<sup>+</sup> cells from the PBMC of S3 samples from two donors (D21 and D22) were purified to 96% and 89%, respectively, by positive immunomagnetic sorting. In situ hybridization was performed with the CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> fractions either immediately or after *ex vivo* culture in the presence of Flt-3L, SCF, IL-3, IL-6, and G-CSF (CD34<sup>+</sup> fraction) or PHA (CD34<sup>-</sup> fraction). The fractions were compared with PHA-stimulated whole blood, non-sorted PBMC from the same samples, or to PHA-stimulated whole blood from samples S1 and S2. We did not attempt to purify CD34<sup>+</sup> cells from S1 and S2 because of limited biological material. While the frequency of chromosome 8 (Figure 7A) and chromosome 17 (Figure 7B) aneuploidy was increased in the CD34<sup>-</sup> fractions of S3 similarly to those observed in whole blood or PBMC from S3 samples, the frequency of aneuploidy in the CD34<sup>+</sup> fractions from S3 did not increase and were comparable to the levels observed in whole blood from S1 and S2. These findings suggest that G-CSF mobilization did not affect CD34<sup>+</sup> cells in regards to cytogenetic abnormalities and that the increase in aneuploidy was induced in more mature cells. The percentage of aneuploid cells in the CD34<sup>+</sup> or CD34<sup>-</sup> fractions were similar whether cell division had been induced or not, demonstrating that cytogenetic abnormalities were present before the induction of proliferation and were not *in vitro* artefacts resulting from cell division.

Since up to 10% of cells were aneuploid for either chromosome 8 or 17, we hypothesized that most cells would suffer cytogenetic abnormalities of at least one of any chromosome pair. To investigate this, we performed karyotype analysis on 15, 50, and 50 metaphases of G-CSF-mobilized PBMC from the three S3 samples harvested from D21, D22, and D23. No karyotypic abnormalities were observed in these samples.

## Discussion

In agreement with previous studies, we observed that the mobilization of peripheral HSC in healthy donors by G-CSF administration increased WBC, PMN, monocyte, and lymphocyte blood counts followed by transient lymphopenia after cytapheresis<sup>16,47-50</sup>. A possible rebound of some lymphocyte subsets may be observed at three months<sup>50</sup>, but the lymphocyte count usually recovers to the normal value one to three months after mobilization<sup>47,48,50</sup>. However, we observed that low NK and T-cell counts could persist for up to six to 12 months post-mobilization. In fact, although WBC, monocyte, and lymphocyte counts usually recover to normal values one year after G-CSF treatment<sup>41,55,56</sup>, persistent neutropenia<sup>42</sup>, monocytopenia<sup>56</sup>, or lymphopenia<sup>42</sup> has been observed in some donors one to three years after mobilization. Overall, G-CSF-induced quantitative perturbations of blood cell counts return to BV in most donors during the first three months post-mobilization. However, less is known concerning the duration of G-CSF-induced functional alterations of lymphocytes. Previous gene profiling studies have demonstrated that G-CSF mobilization induces perturbations of the transcriptome, but the profile returned to pre-treatment levels within two months<sup>57</sup>.

The ability of T cells or NK cells to secrete inflammatory or type 1 cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2 is severely impaired after G-CSF mobilization<sup>15-21,58</sup>. On the other hand, G-CSF has been shown to increase the production of anti-inflammatory or type 2 cytokines<sup>15,22-25</sup>, although its effects on IL-4 production remain controversial<sup>6,12,23,26,27</sup>. As expected, we found that after mobilization the *in vitro* IL-2 production by PHA-stimulated PBMC was decreased, but IL-8 was produced *in vitro* at increased levels<sup>22,58</sup>. IL-8 is the primary cytokine mediating G-CSF-induced HSC mobilization<sup>54</sup>. By contrast, we observed a decreased production of IL-10. This was unexpected, as G-CSF has been previously shown to increase IL-10 production<sup>58</sup> by monocytes<sup>22,59</sup> and T cells<sup>28</sup>. The observed differences may result from the use of different culture protocols (for example, the use of whole blood as opposed to PBMC) or stimuli (LPS or alloantigens as opposed to PHA) leading to a differential involvement of myeloid cells compared to lymphoid cells in the production or consumption of IL-10. The potential for production returned to BV by one month after mobilization for all tested cytokines.

Though G-CSF-mediated modulation of T-cell functions has been extensively studied, the effects of G-CSF on B-cell functions have not been extensively studied. We previously reported that G-CSF-primed B cells exhibited enhanced CD45RO expression, suggesting that G-CSF could activate B cells<sup>32</sup>. This is in line with Morikawa et al<sup>33</sup> who reported that G-CSF

enhanced the production of Ig by human B cells through a direct effect on B-cell functions, unrelated to B-cell proliferation. Such an effect on B-cell priming has clinical relevance when considered with our previous study that found the incidences of anti-HLA<sup>34</sup> and anti-ABO<sup>35</sup> immunizations were higher after PBSC transplantation compared to BMT. The current study confirms that G-CSF mobilization increases the capacity of B cells to secrete IgM and IgG upon PWM stimulation *in vitro*. We also found that the increased potential of *in vitro* IgM production by *in-vivo* G-CSF-primed B cells is maintained for up to six months after G-CSF mobilization. One may hypothesize that such increased potential may have an impact on the risk of adverse events, such as induction or reactivation of auto-immune syndromes after mobilization<sup>60</sup>. Conversely, this B-cell priming effect may be an advantage for PBSC patients with the facilitation of B-cell activation and the improvement of humoral-mediated responses after transplantation. In this setting, it may be of interest to evaluate whether the use of G-CSF for donor HSC mobilization and/or recipient post-transplant G-CSF administration may be advantageous as a possible adjuvant for post-transplant re-immunization protocols<sup>61-63</sup>.

Genetic and epigenetic alterations after G-CSF mobilization have previously been reported by Nagler et al, including an increase in DNA instability<sup>64</sup> as well as altered allele replication timing and increased levels of chromosome missegregation, as evidenced by an increased percentage of monosomy and trisomy of chromosome 17<sup>45</sup>. In this study involving a limited number of donors, DNA instability and the loss of replication synchrony were transient and returned to BV one month and six to nine months after mobilization, respectively, while the percentage of aneuploidy between day 200 and day 270 post-mobilization remained elevated, suggesting that this effect persisted long-term<sup>45</sup>. In a larger cohort of donors, we confirmed that the percentage of aneuploid cells is greatly increased upon G-CSF mobilization and remains significantly higher than BV for up to six months after mobilization, especially for cells with chromosome 8 or 17 monosomy. One year after mobilization, the percentage of aneuploid cells remained slightly, but not significantly, higher than BV. The percentage of aneuploid cells progressively decreased over time and one can extrapolate that a complete return to BV occurs between one and two years after mobilization. Increased frequencies of aneuploid cells may result from the expansion of pre-existing clones with monosomy or trisomy. The return to BV could be due to the replacement of aneuploid cells, which expanded during G-CSF mobilization, by normal, younger cells. In fact, it has been proposed that G-CSF enhances the expansion of pre-existing cells with chromosome 7 monosomy in patients with aplastic anemia<sup>65</sup>. Such cells may have a proliferative advantage resulting from the expression of the class IV G-CSFR isoform. However, this hypothesis does

not explain why cells with chromosome 8 or 17 aneuploidy would also expand during G-CSF mobilization.

As mentioned previously, tetraploidy has been reported in mature myeloid cells, circulating in the blood of G-CSF-mobilized donors<sup>46</sup>. Authors speculated that such tetraploidy might result from one skipped cell division in the promyelocyte stage and that G-CSF therapy may occasionally override the checkpoint control leading to cell apoptosis in the case of incomplete cell division. This is supported by our observations that G-CSF-induced cytogenetic abnormalities in PBMC did not affect CD34<sup>+</sup> cells, but were restricted to CD34<sup>-</sup> PBMC.

The consequences of such numerical chromosomal alterations induced by G-CSF administration are not clear in terms of risk for leukemic transformation in the donor and the patient. The magnitude as well as the duration of alterations, such as described in the present study, raises concerns about the long-term safety of G-CSF administration to donors. Our observation that G-CSF-induced cytogenetic abnormalities affect only mature CD34<sup>-</sup> cells and not CD34<sup>+</sup> cells is of importance and suggests that such abnormalities do not involve progenitor cells at risk for leukemic transformation.

In conclusion, our data show that immunological and cytogenetic perturbations induced by G-CSF administration in normal donors may be more pronounced and persistent than previously described. Such perturbations remain however transient with a return to baseline values within one year for most perturbations. Although G-CSF has been widely used for mobilization of PBSC in normal donors for more than 10 years without any evidence of an increased risk for leukemic transformation, the assessment of potential long-term risks is still needed and will require prolonged medical and biological observations of large cohorts of G-CSF-mobilized PBSC donors.



## **Acknowledgments**

We are grateful to the donors who volunteered to be enrolled in this study. This work was supported by the Agence de la Biomédecine and the Ligue Contre le Cancer, Comité du Doubs. CM is a recipient of a fellowship of Région Franche-Comté and of the Fondation Transplantation (FDTSFV).

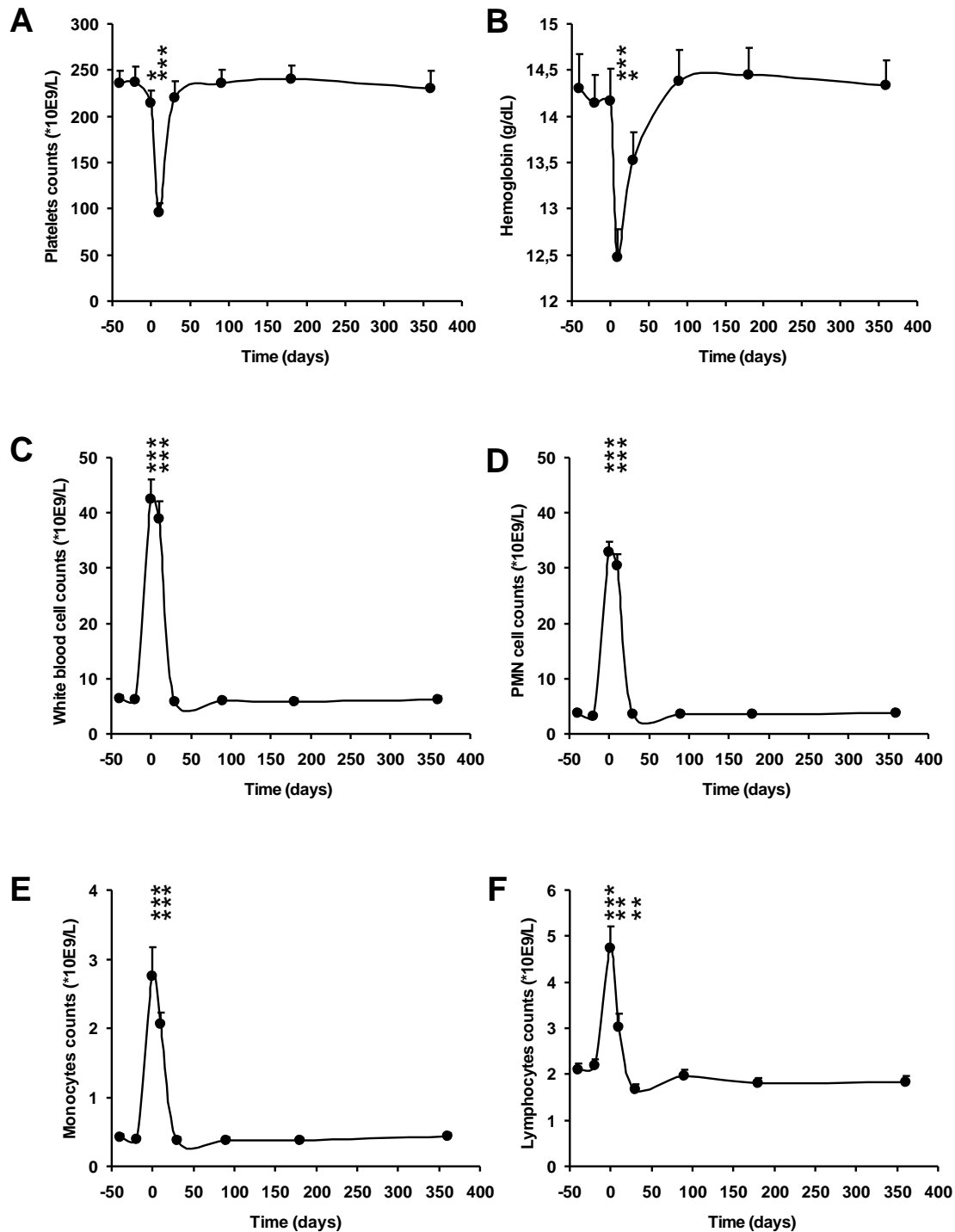
## References

1. Korbling M, Huh YO, Durett A, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy- 1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood*. 1995;86:2842-2848.
2. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: safety, kinetics of mobilization, and composition of the graft. *Br J Haematol*. 1994;87:609-613.
3. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;108:1435-1440.
4. Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Blood*. 1995;86:2220-2227.
5. Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. 1997;89:1629-1634.
6. Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, et al. Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:631-637.
7. Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor- mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. *Blood*. 1998;92:215-222.
8. Tanaka J, Mielcarek M, Torok-Storb B. Impaired induction of the CD28-responsive complex in granulocyte colony- stimulating factor mobilized CD4 T cells. *Blood*. 1998;91:347-352.
9. Ageitos AG, Singh RK, Ino K, et al. IL-2 expansion of T and NK cells from growth factor-mobilized peripheral blood stem cell products: monocyte inhibition. *J Immunother*. 1998;21:409-417.
10. Hartung T, Doecke WD, Bundschuh D, et al. Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66:415-424.
11. Singh RK, Ino K, Varney ML, Heimann DG, Talmadge JE. Immunoregulatory cytokines in bone marrow and peripheral blood stem cell products. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:53-62.
12. Nawa Y, Teshima T, Sunami K, et al. G-CSF reduces IFN- $\gamma$  and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:1035-1040.
13. Joshi SS, Lynch JC, Pavletic SZ, et al. Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood*. 2001;98:1963-1970.
14. Miller JS, Prosper F, McCullar V. Natural killer (NK) cells are functionally abnormal and NK cell progenitors are diminished in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cell collections. *Blood*. 1997;90:3098-3105.
15. Reyes E, Garcia-Castro I, Esquivel F, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) transiently suppresses mitogen-stimulated T-cell proliferative response. *Br J Cancer*. 1999;80:229-235.
16. Tayebi H, Kuttler F, Saas P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. *Exp Hematol*. 2001;29:458-470.

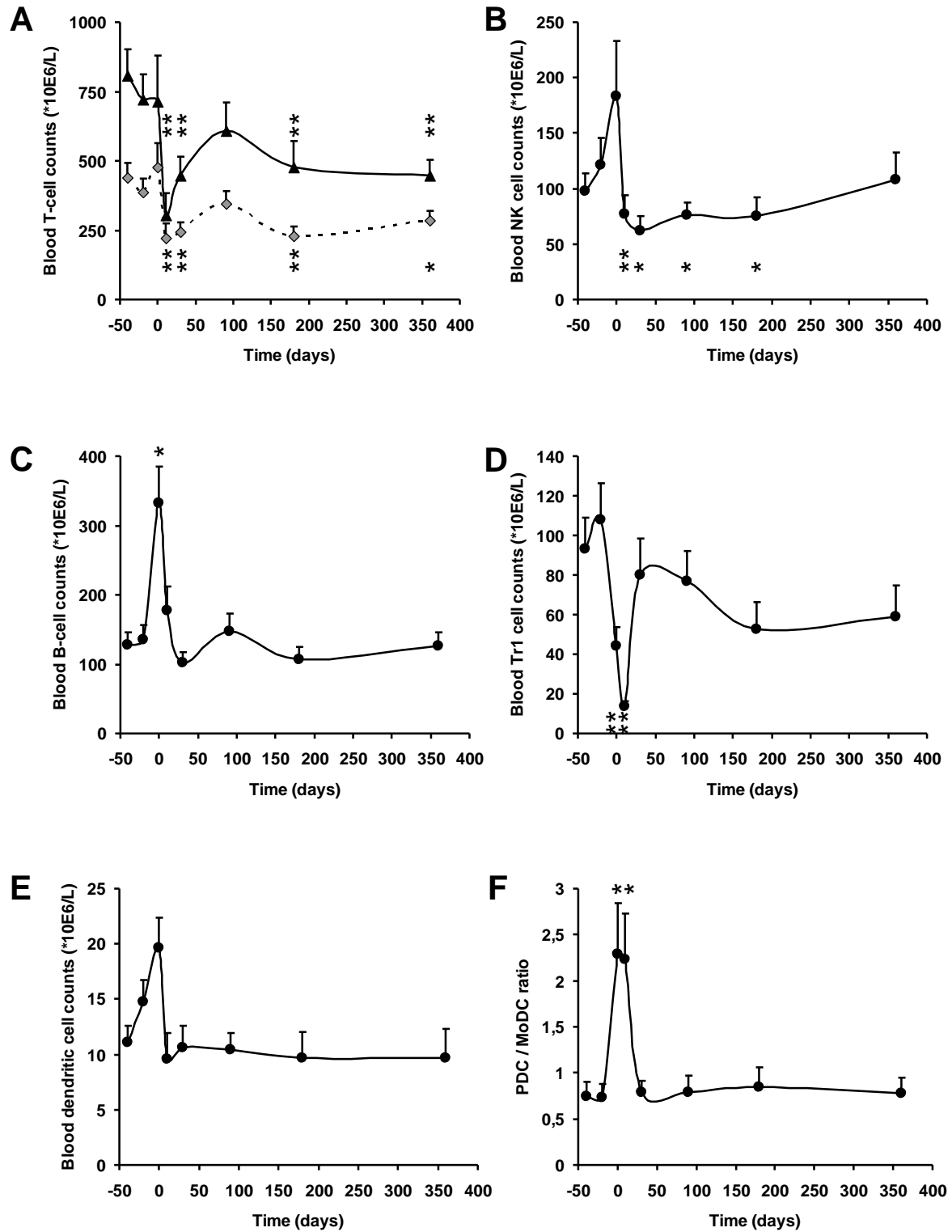
17. Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor-alpha production. *Blood*. 1995;86:2220-2227.
18. Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, et al. Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:631-637.
19. Hartung T, Doecke WD, Bundschuh D, et al. Effect of filgrastim treatment on inflammatory cytokines and lymphocyte functions. *Clin Pharmacol Ther*. 1999;66:415-424.
20. Nawa Y, Teshima T, Sunami K, et al. G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:1035-1040.
21. Boneberg EM, Hartung T. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1beta release via suppressed processing of proIL-1beta, whereas TNF-alpha release is inhibited on the level of proTNF-alpha formation. *Eur J Immunol*. 2002;32:1717-1725.
22. Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T-cell proliferation. *Blood*. 1998;92:215-222.
23. Singh RK, Ino K, Varney ML, Heimann DG, Talmadge JE. Immunoregulatory cytokines in bone marrow and peripheral blood stem cell products. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:53-62.
24. Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP, et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood*. 2000;95:2269-2274.
25. Hartung T. Anti-inflammatory aspects of Filgrastim and impact on IL-2 release. *J Hematother Stem Cell Res*. 1999;8 Suppl 1:S21-22.
26. Tayebi H, Kuttler F, Saas P, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells. *Exp Hematol*. 2001;29:458-470.
27. Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP, et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood*. 2000;95:2269-2274.
28. Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, et al. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood*. 2002;100:2562-2571.
29. Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. 1997;89:1629-1634.
30. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*. 2000;95:2484-2490.
31. Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. *Eur J Immunol*. 2004;34:1291-1302.
32. Tayebi H, Lapierre V, Saas P, et al. Enhanced activation of B cells in a granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cell graft. *Br J Haematol*. 2001;114:698-700.
33. Morikawa K, Miyawaki T, Oseko F, Morikawa S, Imai K. G-CSF enhances the immunoglobulin generation rather than the proliferation of human B lymphocytes. *Eur J Haematol*. 1993;51:144-151.
34. Lapierre V, Auperin A, Tayebi H, et al. Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood

- hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;100:1484-1489.
35. Lapiere V, Oubouzar N, Auperin A, et al. Influence of the hematopoietic stem cell source on early immunohematologic reconstitution after allogeneic transplantation. *Blood*. 2001;97:2580-2586.
  36. Anderlini P, Korbling M, Dale D, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: considerations for donors. *Blood*. 1997;90:903-908.
  37. Le Deley MC, Suzan F, Cutuli B, et al. Anthracyclines, mitoxantrone, radiotherapy, and granulocyte colony-stimulating factor: risk factors for leukemia and myelodysplastic syndrome after breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:292-300.
  38. Tighe CC, McKoy JM, Evens AM, Trifilio SM, Tallman MS, Bennett CL. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant*. 2007.
  39. Bennett CL, Evens AM, Andritsos LA, et al. Haematological malignancies developing in previously healthy individuals who received haematopoietic growth factors: report from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project. *Br J Haematol*. 2006;135:642-650.
  40. Makita K, Ohta K, Mugitani A, et al. Acute myelogenous leukemia in a donor after granulocyte colony-stimulating factor-primed peripheral blood stem cell harvest. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:661-665.
  41. Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, et al. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:85-89.
  42. Tassi C, Tazzari PL, Bonifazi F, et al. Short- and long-term haematological surveillance of healthy donors of allogeneic peripheral haematopoietic progenitors mobilized with G-CSF: a single institution prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:289-294.
  43. Sakamaki S, Matsunaga T, Hirayama Y, Kuga T, Niitsu Y. Haematological study of healthy volunteers 5 years after G-CSF. *Lancet*. 1995;346:1432-1433.
  44. Hasenclever D, Sextro M. Safety of AlloPBPC donors: biometrical considerations on monitoring long term risks. *Bone Marrow Transplant*. 1996;17 Suppl 2:S28-30.
  45. Nagler A, Korenstein-Ilan A, Amiel A, Avivi L. Granulocyte colony-stimulating factor generates epigenetic and genetic alterations in lymphocytes of normal volunteer donors of stem cells. *Exp Hematol*. 2004;32:122-130.
  46. Kaplinsky C, Trakhtenbrot L, Hardan I, et al. Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:31-34.
  47. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Mazzara R, Rozman C, Montserrat E. Granulocyte colony-stimulating factor administration and peripheral blood progenitor cells collection in normal donors: analysis of leukapheresis-related side effects. *Blood*. 1996;87:4916-4917.
  48. Martinez C, Urbano-Ispizua A, Rozman C, et al. Effects of G-CSF administration and peripheral blood progenitor cell collection in 20 healthy donors. *Ann Hematol*. 1996;72:269-272.
  49. Anderlini P, Przepiorka D, Seong D, Champlin R, Korbling M. Transient neutropenia in normal donors after G-CSF mobilization and stem cell apheresis. *Br J Haematol*. 1996;94:155-158.
  50. Korbling M, Anderlini P, Durett A, et al. Delayed effects of rhG-CSF mobilization treatment and apheresis on circulating CD34+ and CD34+ Thy-1dim CD38- progenitor cells, and lymphoid subsets in normal stem cell donors for allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18:1073-1079.

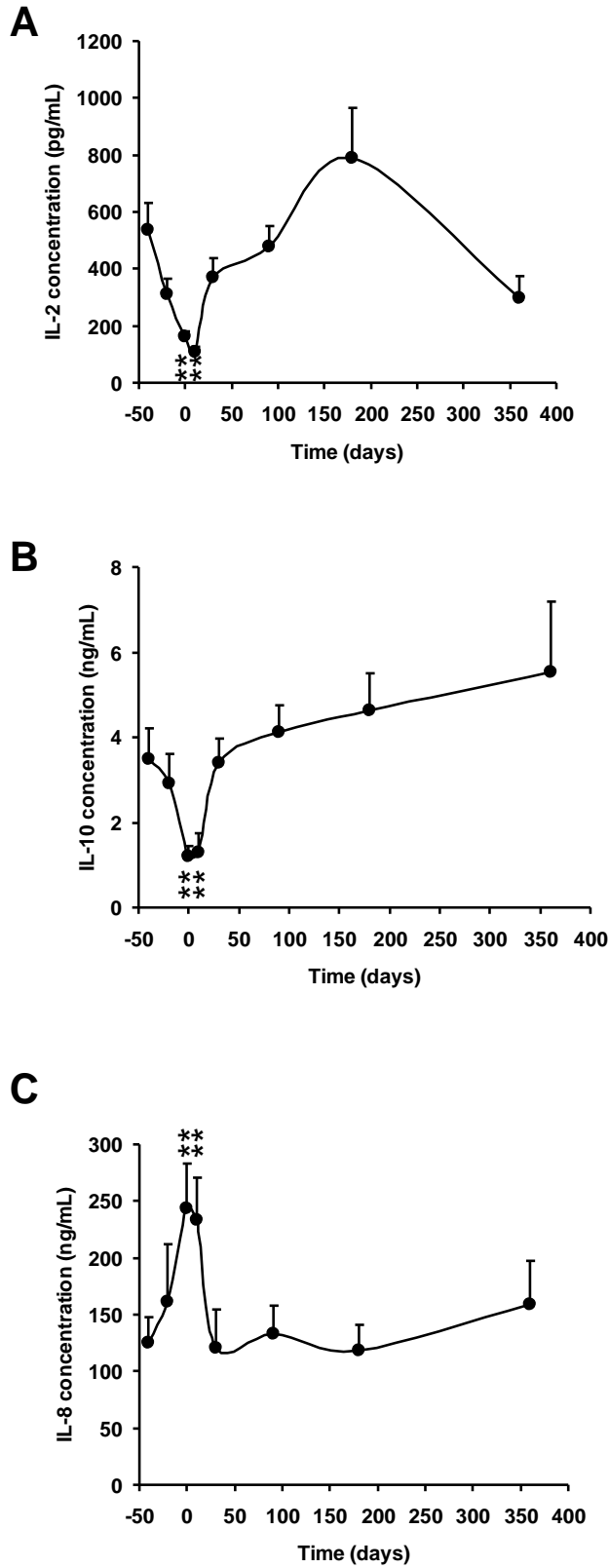
51. Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.* 2005;175:7085-7091.
52. Rahmoun M, Foussat A, Groux H, Pene J, Yssel H, Chanez P. Enhanced frequency of CD18- and CD49b-expressing T cells in peripheral blood of asthmatic patients correlates with disease severity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006;140:139-149.
53. Klanginsirikul P, Russell NH. Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed Th2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp Hematol.* 2002;30:495-501.
54. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood.* 2004;103:1580-1585.
55. Stroncek DF, Clay ME, Herr G, Smith J, Ilstrup S, McCullough J. Blood counts in healthy donors 1 year after the collection of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized progenitor cells and the results of a second mobilization and collection. *Transfusion.* 1997;37:304-308.
56. Storek J, Dawson MA, Maloney DG. Normal T, B, and NK cell counts in healthy donors at 1 year after blood stem cell harvesting. *Blood.* 2000;95:2993-2994.
57. Hernandez JM, Castilla C, Gutierrez NC, et al. Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. *Leukemia.* 2005;19:1088-1091.
58. Hartung T, Docke WD, Gantner F, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood.* 1995;85:2482-2489.
59. Fraser AR, Cook G, Franklin IM, et al. Immature monocytes from G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell collections carry surface-bound IL-10 and have the potential to modulate alloreactivity. *J Leukoc Biol.* 2006;80:862-869.
60. Tighe CC, McKoy JM, Evens AM, Trifilio SM, Tallman MS, Bennett CL. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:185-192.
61. Goldberg SL, Cicogna CE, Rowley SD, Pecora AL. Vaccinations against infectious diseases in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Oncology (Williston Park).* 2003;17:539-554, 559; discussion 559-560, 564-535.
62. Ljungman P, Engelhard D, de la Camara R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:737-746.
63. Machado CM. Reimmunization after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4:219-228.
64. Shapira MY, Kaspler P, Samuel S, Shoshan S, Or R. Granulocyte colony stimulating factor does not induce long-term DNA instability in healthy peripheral blood stem cell donors. *Am J Hematol.* 2003;73:33-36.
65. Sloand EM, Yong AS, Ramkissoon S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:14483-14488.



**Figure 1.** (A) Blood cell counts (mean $\pm$ SE) of platelets, (B) hemoglobin level (mean $\pm$ SE), (C) blood cell counts of WBC, (D) PMN, (E) monocytes, and (F) lymphocytes. Samples S1 and S2 were harvested before G-CSF mobilisation at day 30 $\pm$ 6 and 5 $\pm$ 1, respectively, before the first cytopheresis procedure, and S3 to S8 were harvested at day 0, 0.7 $\pm$ 0.2, 32 $\pm$ 1, 92 $\pm$ 1, 184 $\pm$ 1, and 366 $\pm$ 2, respectively, after the first cytopheresis procedure. For clarity, data from samples S1 to S8 were arbitrarily set at -40, -20, 0, 10, 30, 90, 180, and 360 days, respectively. Each time point was compared with the mean of baseline values S1 and S2 using a paired t-test. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .005$ ; \*\*\* $P < 10^{-5}$

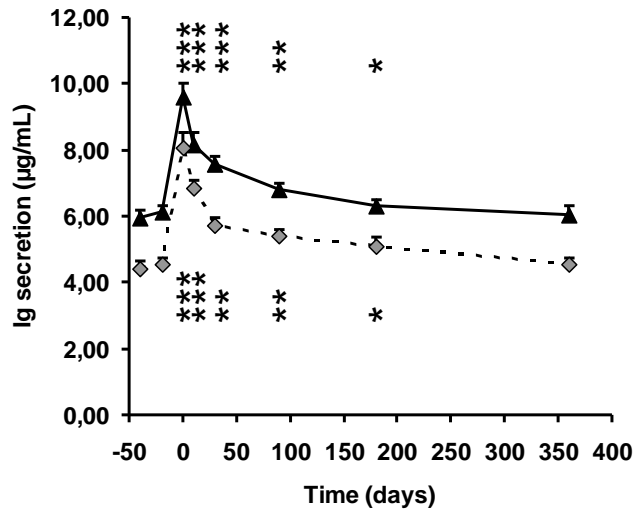


**Figure 2.** (A) Blood cell counts of CD4 (black triangles, full line) and CD8 (grey diamonds, dashed line) T cells, (B) NK cells, (C) B cells, (D) T<sub>H</sub>1 cells, (E) total DC, and (F) the ratio of PDC to MoDC blood cell counts. Data are presented and analyzed as indicated in the legend of Figure 1.

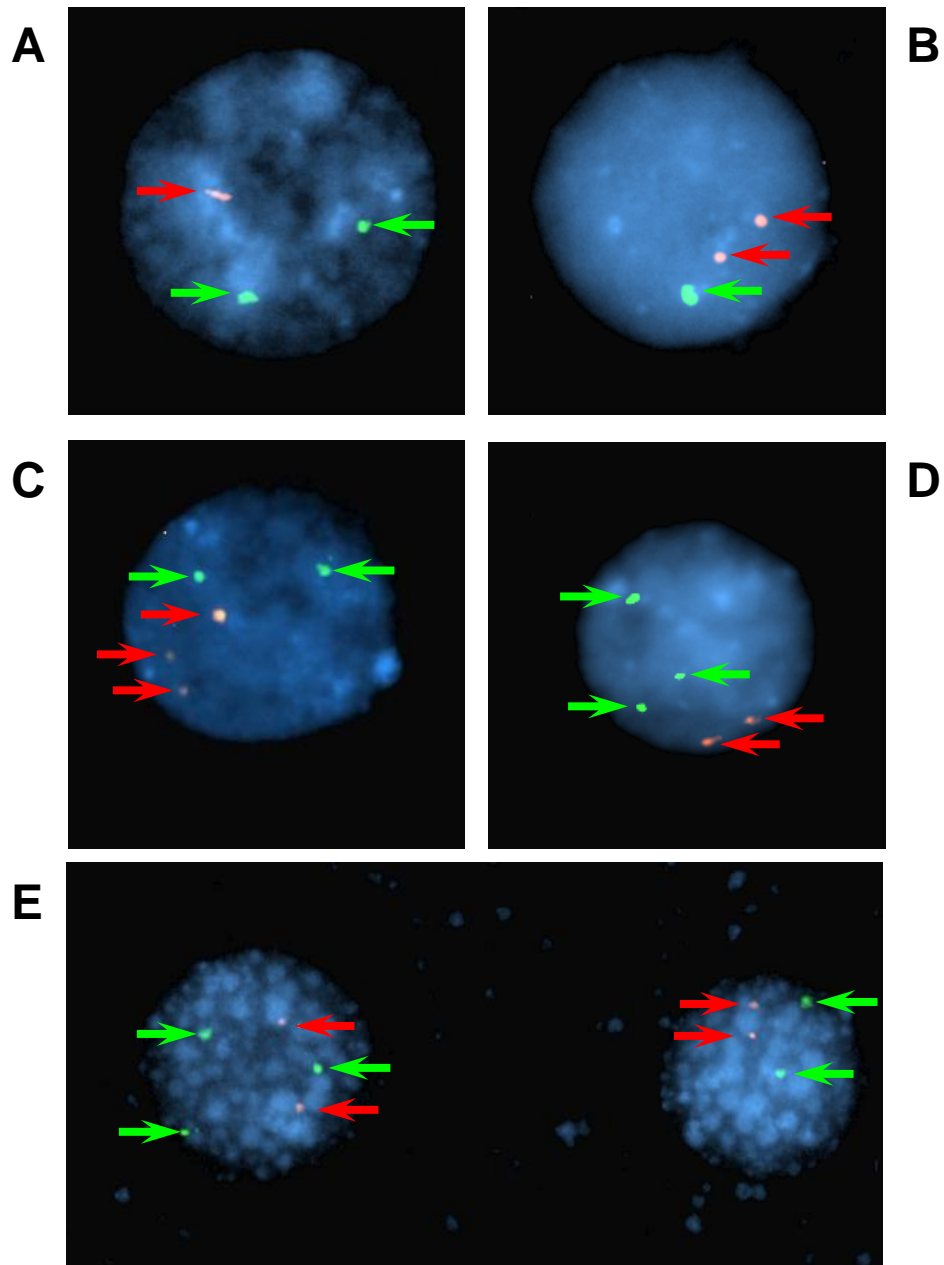


**Figure 3.** (A) *In vitro* production of IL-2, (B) IL-10, and (C) IL-8 in the 24 hour supernatant of PHA-stimulated PBMC. Data are presented and analyzed as indicated in legend of Figure 1.

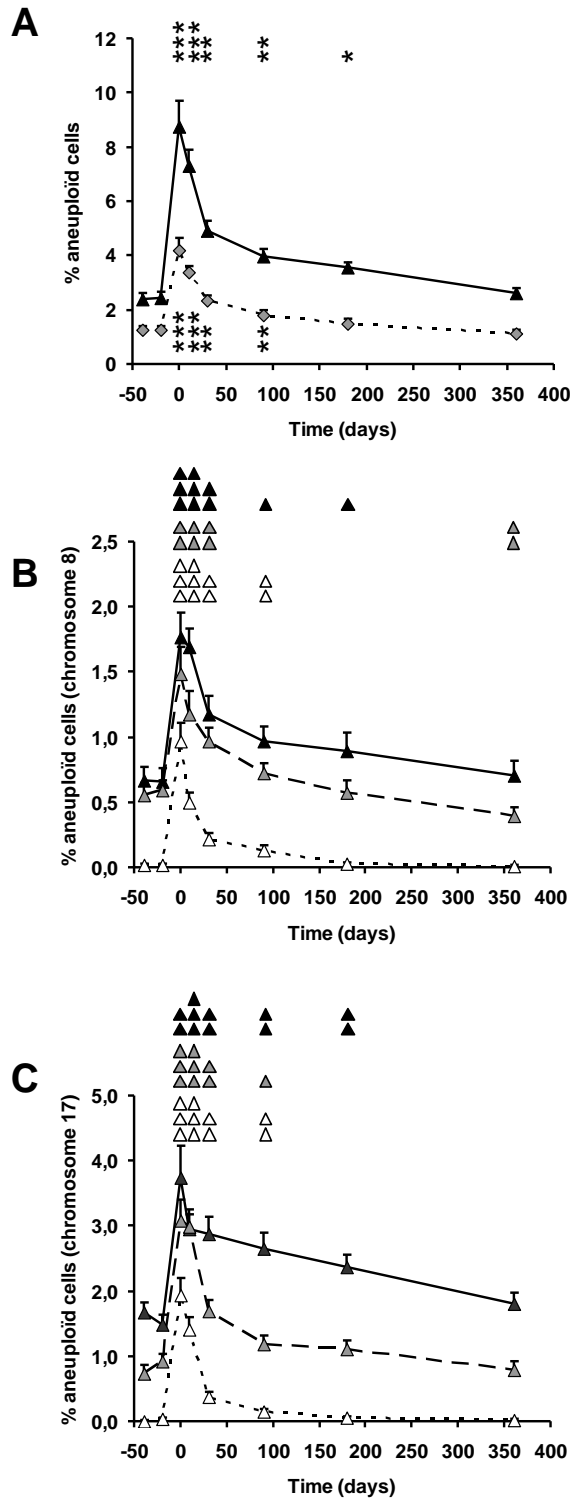




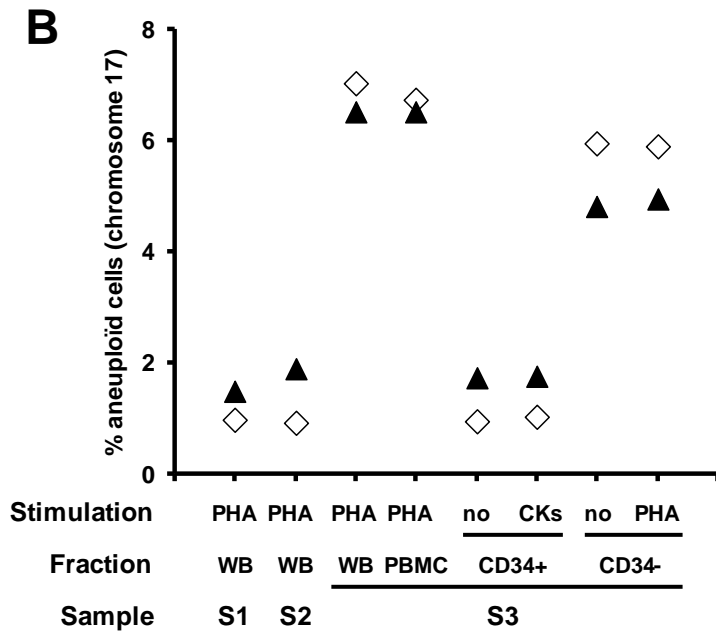
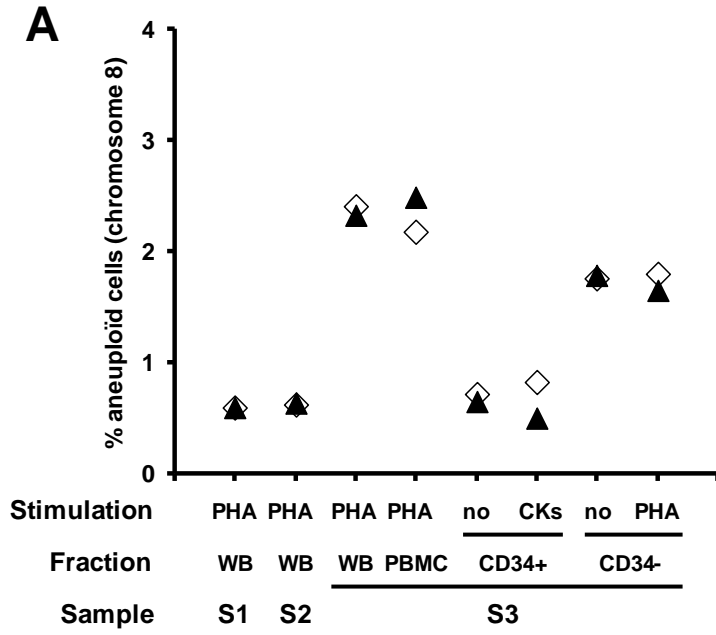
**Figure 4.** *In vitro* production of IgM (grey diamonds, dashed line) and IgG (black triangles, full line) in the 14 day supernatant of PWM-stimulated PBMC. Data are presented and analyzed as indicated in the legend of Figure 1.



**Figure 5. Cytogenetic analysis of PBMC from normal donors after G-CSF mobilisation.** FISH of cells from samples S3 or S4 showing a monosomy (A, B) or trisomy (C, D and E, left) of chromosome 8 (A, C) and 17 (B, D and E) as well as a normal nucleus (E, right). Staining of chromosomes 8 and 17 centromeres are indicated by red and green arrows, respectively.



**Figure 6. Analysis of aneuploidy.** (A) The percent of cells aneuploid for chromosome 8 (grey diamonds, dashed line) and 17 (black triangles, full line) are presented and analyzed as indicated in the legend of Figure 1. (B) The percent of cells with monosomy (black triangles, full lines), trisomy (grey triangles, dashed lines) and multisomy (white triangles, small dashed lines) are shown for chromosome 8 and (C) 17. Black, grey and white triangles refer to  $P$  values of monosomy, trisomy and multisomy, respectively, with one symbol:  $P < .05$ ; two vertical symbols:  $P < .005$ ; and three vertical symbols:  $P < 10^{-5}$ .



**Figure 7. Analysis of aneuploidy in CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cells.** CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> cells were purified from PBMC of G-CSF-mobilized S3 samples harvested from two donors, D21 (black triangles) and D22 (white diamonds). Sorted cells were analyzed for aneuploidy either immediately after sorting, without stimulation (no), or 3 days after stimulation with cytokines (CK) or PHA. They were compared with PHA-stimulated PBMC before sorting or to PHA-stimulated whole blood (WB) of samples S1, S2 (harvested before mobilization), and S3 from the same donors.

## Allografting

# Peripheral T-cell expansion and low infection rate after reduced-intensity conditioning and allogeneic blood stem cell transplantation

F Larosa<sup>1,2,3,4,5</sup>, C Marmier<sup>2,3,4,5</sup>, E Robinet<sup>2,3,4,5</sup>, C Ferrand<sup>2,3,4,5</sup>, P Saas<sup>2,3,4,5</sup>, E Deconinck<sup>1,2,3,4,5</sup>, C-E Bulabois<sup>1,6</sup>, P-S Rohrllich<sup>1,2,3,4,5</sup>, K Ledu<sup>1</sup>, P Helias<sup>1</sup>, P Tiberghien<sup>2,3,4,5</sup> and J-Y Cahn<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology, Centre Hospitalo-Universitaire Jean Minjoz, Besançon Cedex, France; <sup>2</sup>INSERM U645, Besançon Cedex, France; <sup>3</sup>Université EA 2284, Besançon Cedex, France; <sup>4</sup>EFS Bourgogne/Franche-Comté, Besançon Cedex, France; and <sup>5</sup>IFR 133 IBCT, Besançon Cedex, France

### Summary:

Peripheral blood stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning (RIC-PBSCT) regimen is an alternative to conventional regimens with less immediate toxicity. Since immune recovery is of crucial importance for the control of infections, we retrospectively studied the recovery of T-, B- and NK cell subsets in 20 consecutive patients undergoing RIC-PBSCT. We also studied the thymic output using T-cell receptor excision circle assay. Engraftment was rapid and few infectious complications were seen: three early (before 2.5 months) cases of asymptomatic cytomegalovirus reactivation, two late Gram-negative bacterial infections and no fungal infection. While CD4+ T-cell reconstitution was slow, CD8+ T-cell counts were close to normal values at 4 months. Median CD19+ B-cell counts reached normal values at 11 months. Rapid CD56+ NK cell reconstitution was noticed as early as 1.5 months. Low T-cell receptor excision circle numbers and preponderance of memory-type subsets among T cells further suggested that CD8+ T-cell reconstitution resulted predominantly from peripheral expansion and that thymic-dependent reconstitution was severely impaired. In conclusion, large peripheral T-cell expansion may compensate for late thymic-dependent lymphopoiesis, and may, with other factors such as NK and B-cell reconstitution and careful anti-infectious prophylaxis, help limit the incidence of severe infections after RIC-PBSCT.

*Bone Marrow Transplantation* (2005) 35, 859–868.

doi:10.1038/sj.bmt.1704889

Published online 14 March 2005

**Keywords:** reduced-intensity conditioning regimen; stem cell transplantation; immune reconstitution; peripheral expansion; T cell

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) after reduced-intensity conditioning (RIC) is less toxic than conventional allogeneic HSCT for patients with selected malignant hematologic disorders or solid tumors.<sup>1–5</sup> The reduced mucosal toxicity of RIC and the shorter period of neutropenia are associated with decreased risk of early bacteremia, but identical risk of fungal infections compared to myeloablative conditioning regimen.<sup>6–8</sup> Similarly, the long-term overall incidence of viral infections after RIC-HSCT, especially CMV disease (leading to significant mortality and mortality rate in HSCT<sup>9,10</sup>), remains comparable to myeloablative HSCT. However, the occurrence of CMV disease seems to be delayed beyond the 100 first days post transplant.<sup>11</sup>

Accelerated CD4+ T-cell recovery decreases the infection risk after HSCT.<sup>12</sup> CD4+ T-cell reconstitution is performed through an early peripheral expansion of graft mature memory T cells<sup>13,14</sup> followed by a central output of naïve thymic emigrants.<sup>15,16</sup> Different studies evaluating the impact of the source of graft in the allogeneic myeloablative setting emphasize a faster T-cell recovery using peripheral blood stem cells (PBSC) as compared with bone marrow.<sup>17–20</sup> We analyzed 20 consecutive patients receiving RIC and unmanipulated allogeneic PBSC transplantation (RIC-PBSCT) and monitored immunophenotypic features of circulating lymphoid contingent and thymic emigrants (TREC (thymic TCR rearrangement excision circle)) up to 3.5 years.

### Patients and methods

#### Recipients

In all, 20 patients receiving an allogeneic RIC-PBSCT between November 1999 and May 2003 were retrospectively analyzed after approval by the local ethics committee. Pre-transplant characteristics are summarized in Table 1. All patients were ineligible for conventional allogeneic transplantation. Eight patients were at high-risk of CMV disease (donor-positive or -negative/recipient CMV seropositive), four patients at intermediate-risk (donor positive/recipient seronegative) and then eight patients at low-risk (donor and recipient seronegative).<sup>11</sup> Five patients (# 1, 2,

Correspondence: Dr F Larosa, Department of Hematology, Centre Hospitalo-Universitaire Jean Minjoz, 1 Bd Alexander Fleming, 25020 Besançon Cedex, France; E-mail: flarosa@chu-besancon.fr

<sup>6</sup>Current address: Department of Hematology, Centre Hospitalo-Universitaire, Grenoble, France

Received 10 June 2004; accepted 23 December 2004

Published online 14 March 2005

**Table 1** Pre-transplant donor (D) and recipient (R) clinical features

Patients	Age (years) D/R	Sex D/R	CMV (IgG) D/R	Disease status	CD34+ cells (10 <sup>6</sup> /kg)	CD3+ cells (10 <sup>6</sup> /kg)	Diagnosis	Regimens	GvHD prophylaxis
1	50/54	M/M	-/-	PD	3	126.5	CMML	F-Ida-Ara-C	CSA-MTX
2	65/59	M/F	-/-	PD	NA	45.5	CML	F-Bus-ATG	CSA-MTX
3*	50/53	M/M	-/-	PD	7.2	111.2	Myeloma	F-Bus-ATG	CSA
4*	58/55	F/F	-/-	PR	11	129.9	Breast cancer	F-Bus-ATG	CSA
5	66/65	F/M	+/-	PD	5.1	63.7	Myelofibrosis	F-Bus-ATG	CSA
6	45/57	F/M	-/+	PD	7.4	351.7	NHL	F-TBI	CSA-MMF
7*	59/50	F/M	+/+	PD	7.9	414.4	CML	F-Cy-ATG	CSA-MMF
8*	40/39	M/M	-/+	CR	6.9	77.1	Myeloma	F-Bus-ATG	CSA
9	51/60	F/F	+/+	CR	9.2	166.2	Acute leukemia	F-Bus-ATG	CSA
10	52/48	F/F	+/-	PR	NA	319	Renal carcinoma	F-Bus-ATG	CSA
11*	33/29	F/M	+/-	CR	9.5	260	Acute leukemia	F-TBI-ATG	CSA-MMF
12	50/56	M/F	-/-	PR	14	481.3	NHL	F-TBI	CSA-MMF
13	43/47	M/M	-/+	PR	4.6	359.8	NHL	F-TBI	CSA-MMF
14*	41/46	M/M	-/-	PD	5	130.9	NHL	F-TBI	CSA-MMF
15	27/53	M/M	-/-	PD	13.7	166.3	Acute leukemia	F-Bus-ATG	CSA
16	62/61	M/M	-/-	CR	9.5	225.4	Acute leukemia	F-TBI	CSA-MMF
17	49/46	F/F	+/+	PD	7.8	NA	Ovarian cancer	F-Bus-ATG	CSA
18	65/53	F/M	+/+	CR	5.1	258.7	Acute leukemia	F-Bus-ATG	CSA
19	34/44	M/M	-/+	PD	12	NA	Myelofibrosis	F-TBI	CSA-MMF
20	42/50	M/M	+/-	PD	5	170.2	Renal carcinoma	F-Bus-ATG	CSA-MMF
Median (range)	50/53 D: (27-66) R: (29-65)	Sex mismatch F/M: n = 5		CR: n = 5 PR: n = 4 PD: n = 11	7.6 (3.0-14.0)	168.3 (45.5-481.3)			

PD = progressive disease; PR = partial response; CR = complete response; NA = not available; F = fludarabine; Ida = idarubicin; Ara-C = cytarabine; Bus = busulfan; ATG = anti-human thymoglobulin; Cy = cyclophosphamide; TBI = total body irradiation.

\*Patient receiving prior autograft.

3, 4, 9) received donor lymphocyte infusions (DLI) after transplantation: four patients received two subsequent DLI and one patient a single DLI. The median time from transplant to reinfusion was 106 days (84-393) for the first DLI and 180 days (120-240) for the second (Table 2). The reasons for DLI were, respectively: three patients with relapse and two patients with mixed chimerism for 1st DLI, one patient with relapse and three patients with mixed chimerism for the 2nd DLI. All patients receiving DLIs were included in the T-cell recovery analyses, except patient 1 (Figure 2a and b) and patient 3 (Figures 2c-e and 3a).

#### Donors and graft characteristics

Donor characteristics are summarized in Table 1. In all, 18 donors were HLA-genotypical siblings and two were HLA-matched unrelated volunteer donors (donor of recipient # 11: HLA class I and class II identical; donor of recipient # 7: one HLA-DP mismatch). HLA class I - HLA-A,-B,-C - and HLA class II - HLA-DR, DP, DQ - genotyping were performed with sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR). PBSCs were collected following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor 5 µg/kg twice daily subcutaneous for 5 days. Leukapheresis was performed on day 5 ± day 6 to reach at least 4 × 10<sup>6</sup> CD34+ cells/kg. All leukapheresis were performed with the Spectra system (COBE, Denver, CO, USA). The median number of infused CD34+ cells and CD3+ cells were, respectively, 7.6 × 10<sup>6</sup>/kg (3-14), 168.3 × 10<sup>6</sup>/kg (45.5-481.3) (Table 1).

#### Preparative regimens

Seven patients received a combination of a single dose total body irradiation (200 cGy; day -1 or day -5) and fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup> once daily from day -4 to day -2 with, for one patient (11), ATG (MTIX Sangstat SAS Lyon, France) 2.5 mg/kg daily from day -4 to day -3. A total of 13 patients received fludarabine-based regimen administered at 30 mg/m<sup>2</sup> once daily from day -4 to day -2, of which 11 patients received oral busulfan 2 mg/kg once daily from day -4 to -3 and ATG (with the same schedule as described above), one received cyclophosphamide 30 mg/kg once daily from day -4 to day -3 associated with ATG and one received idarubicin (21 mg/m<sup>2</sup>, day -12 and day -11) and cytarabine (2 g/m<sup>2</sup>, from day -5 to day -2).

#### Graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis

GvHD prophylaxis consisted of either oral CSA 4.5 mg/kg/day peritoneally (p.o.) from day -3 (adapted to pharmacokinetic assays - laboratory normal values: 100-300 ng/ml) with mycophenolate mofetil 2 g daily from day -1 to day +28 (n = 9 patients), or CSA intravenously (i.v.) 2.5 mg/kg twice daily day -3 to day -1, and then tapered to 3 mg/kg once daily (adapted to pharmacokinetic assays) with (n = 2) or without (n = 9) methotrexate 15 mg/m<sup>2</sup> at day 1 and 10 mg/m<sup>2</sup> at day 3 and day 6 post transplant. In the absence of GvHD, CSA was tapered at 3 months from 10% every 10-15 days, according to chimerism analysis and stopped after about 6 months.

**Table 2** Post transplantation clinical results

<i>Patients</i>	<i>aGVHD (day)</i>	<i>cGVHD (day)</i>	<i>CD3+ chimerism (% donor) at 2.5 months</i>	<i>DLI (day)</i>	<i>Bacterial infections (day)</i>	<i>CMV antigenemia (day)</i>	<i>Follow-up, November 2003</i>	<i>Cause of death</i>
1	Grade II (35)		50	106 and 197			Dead at D343	ARDS
2			14	86 and 163			Alive, CR at D1279	
3		Extensive (D140)	97.5	84 and 120			Alive, PD at D731	
4		Limited (D100)	100	393			Alive, PD at D640	
5	Grade II (9)	Extensive (D160)	100				Dead at D278	GvHD
6	Grade II (29)	Extensive (D144)	76			56	Dead at D179	GvHD
7	Grade II (11)		100			80	Dead at D120	Disease progression
8		Limited (D180)	70				Dead at D480	Relapse
9			26	112 and 240			Dead at D507	Relapse
10	Grade II (93)		74				Dead at D308	GvHD
11	Grade II (45)		100				Alive, CR at D422	
12	Grade II (54)		100			30	Alive, CR at D445	
13	Grade II (40)		NA				Alive, CR at D452	
14	Grade III (30)		92		127		Dead at D128	Disease progression
15	Grade II(30)	Extensive (D100)	84		135		Dead at D143	Disease progression
16	Grade II (38)		NA				Alive, CR at D529	
17			96				Alive, PD at D214	
18			82				Alive, CR at D208	
19	Grade I (45)		86				Alive, PR at D242	
20	Grade II (83)		94				Alive, PR at D311	
Median (range)	D38 (9–93)	D142 (100–180)	89 (14–100)				D327 (120–1279)	

#### *Infectious supportive care*

All patients received oral bacterial prophylaxis using phenoxymethylpenicilline 3 MU/day or spiramycine 3 MU/day, viral prophylaxis with valaciclovir p.o. 500 mg/twice daily when donor and recipient (D/R) were serologically CMV negative and 1 g × 3/day when D and/or R was serologically CMV positive. Oral fluconazole 200 mg daily was administered for fungal prophylaxis. Finally, all patients received pentamidine inhalation monthly or oral cotrimoxazole daily to prevent *Pneumocystis carinii*. Immunoglobulin levels were checked before and weekly after transplantation. Supplemental polyvalent immunoglobulins G (Tegeline<sup>®</sup>, LFB les Ullis, Courtaboeuf, France) were infused (400 mg/kg) when level of immunoglobulin G was lower than 5 g/l. Bacterial, fungal and viral prophylaxis was started at day -1 and stopped, in the absence of GvHD and of immunosuppressive regimen, after about 6 months.

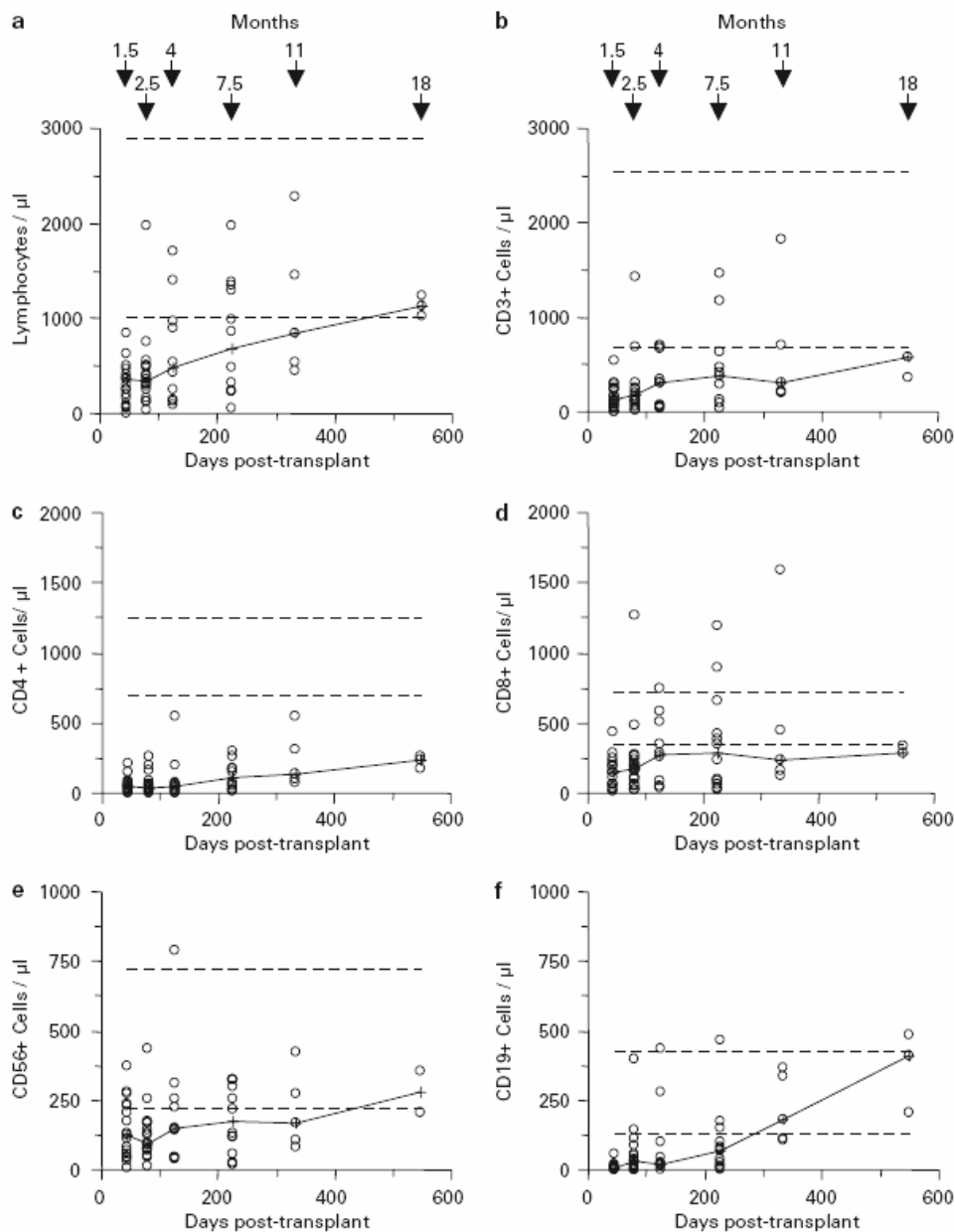
Blood CMV pp65 antigenemia was assessed weekly until withdrawal of immunosuppression as described<sup>21</sup> (CINAKIT, Argene Biosoft, France). A patient was considered positive when having at least two infected cells out of 2 × 10<sup>5</sup> leukocytes. Patients with two consecutive positive CMV antigenemia received pre-emptive therapy with ganciclovir 5 mg/kg i.v. twice daily or 3 g p.o. daily for 2 weeks, or longer if the assay remained positive. CMV disease was defined as described previously.<sup>11</sup> Fungal infections were assessed weekly at least until withdrawal of immunosuppression and classified according to the international consensus.<sup>22</sup> Concerning bacterial infections, central blood cultures were performed only in case of

fever greater than 38°C or clinical signs of infections in hospitalized patients to identify the etiology of bacteria and fungal infections and routine urine samples were assessed weekly in hospitalized patients for bacteria and fungal infections.

Discharged patients were followed up weekly for CMV and fungal Aspergillosis infections at least until withdrawal of immunosuppressive treatment. Oral empiric broad-spectrum antibiotics (ciprofloxacin and cefpodoxime proxitil) were begun at home in case of temperature greater than 38°C.

#### *Cell counts and analysis of cell surface markers*

Blood lymphocyte counts were routinely evaluated using a HST 201 automate (Sysmex, Kobe, Japan) at different time periods after transplantation: M + 1.5 (days 30–60 post transplant), M + 2.5 (days 61–100), M + 4 (days 101–150), M + 7.5 (days 151–300), M + 11 (days 301–365) and M + 18 (days 366–730). Lymphocyte subset frequencies were analyzed (Figures 1 and 2a, b) by direct double or triple immunostaining of fresh whole blood with FITC-CD3, PE-CD8 (Diaclone, Besançon, France), FITC-CD8, FITC-CD19, FITC-CD57, APC-CD4 (Beckman Coulter), PE-CD56 and PE-anti-HLA-DR (Becton Dickinson) mAbs for 20 min at room temperature, RBC lysis with a FACS Lysing solution (Becton Dickinson) and flow cytometry analysis (FACS CALIBUR, Becton Dickinson<sup>®</sup>) after acquisition of at least 2500 events in the lymphocyte size/structure gate. Frequencies were then converted into absolute counts by multiplying the percent of stained lymphocytes by the absolute peripheral

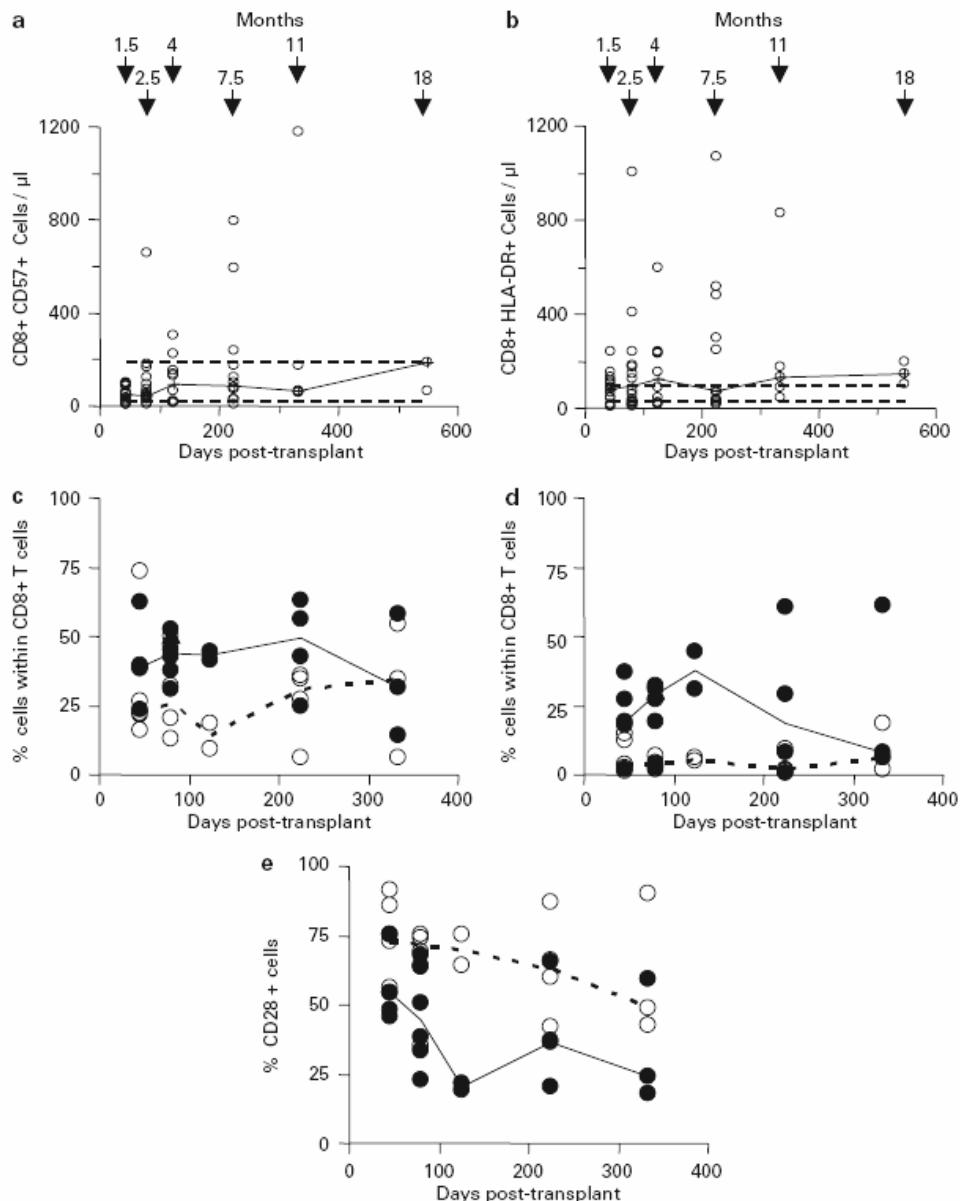


**Figure 1** Recovery of (a) lymphocytes, (b) CD3+, (c) CD4+, (d) CD8+, (e) CD56+ and (f) CD19+ cell counts, shown at the median time of each period of analysis (see Patients and methods). Median cell counts are shown as black lines and normal values (minimal and maximal values) as horizontal dotted lines. Each dot represents one patient. The number of analyzed patients and the number of evaluable patients were, respectively, 17 and 20 at M + 1.5, 18 and 20 at M + 2.5, 10 and 18 at M + 4, 12 and 16 at M + 7.5, 5 and 13 at M + 11 and 3 and 11 at M + 18.

blood lymphocyte count. Minimal and maximal normal values have been defined in the laboratory by testing 40 healthy donors. A retrospective four-color analysis was performed (Figures 2c-e and 3a) on cryopreserved PBMC by incubation for 20 min at 4°C with the following monoclonal antibodies: FITC-CD3, FITC-CD45RA, PE-CD8 (Diaclone), FITC-CD57, FITC-CD19, CyChrome-CD45RO, APC-CD4 (Beckman Coulter) and

FITC-CD28, PE-CD27, PE-CD45RO, PE-CD56, PE-CD57, PE-anti-HLA-DR, PC5-CD45RA, APC-CD4 and APC-CD8 (Becton Dickinson Biosciences). The cells were then fixed with 2% formaldehyde solution for subsequent analysis by flow cytometry of at least 5000 events in the lymphocyte size/structure gate. Only patients with at least three samples available ( $n=2-6$ ) were included in this retrospective study.



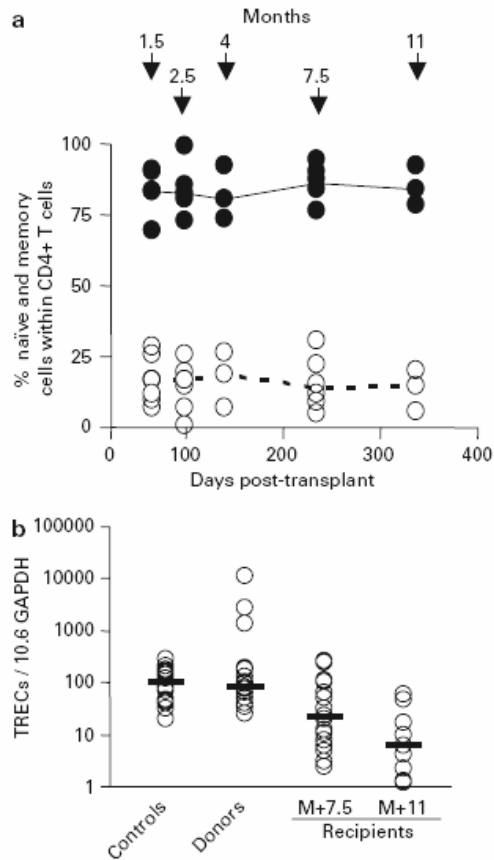


**Figure 2** Recovery of (a) CD8+ CD57+ and (b) CD8+ HLA-DR+ cell counts. Data are expressed as in Figure 1. (c) Frequency of CD45RA+ CD27+ naive (black circles, solid line) and CD45RA- CD27+ early memory (white circles, dotted line) cells, expressed as the percent of cells within CD8+ T cells. (d) Frequency of CD45RA+ CD27- effector (black circles, solid line) and CD45RA- CD27- late memory (white circles, dotted line) cells, expressed as the percent of cells within CD8+ T cells. (e) Frequency of CD28+ cells within CD45RA+ CD27+ naive (black circles, solid line) and CD45RA- CD27+ early memory (white circles, dotted line) CD8+ T cells. Each dot represents one patient ( $n=2-6$ ). Median values are shown as solid and dotted lines.

### TREC quantification

The signal-joint TREC were retrospectively quantified in PBMC by means of real-time quantitative PCR with Taqman assays. The PCR primer sequences were as follows: sense, 5'-GCC AGC TGC AGG GTT TAG G-3'; antisense, 5'-CAT CCC TTT CAA CCA TGC TGA

CAC CTC T-3'. The probe sequence was: 5'-FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-TAMRA-3'.<sup>23</sup> Each PCR reaction was performed with 500 ng of genomic DNA with the use of Master Mix PCR probe 2× Quantitect™ (Qiagen, France) (containing Hotstar *Taq* DNA polymerase, dNTP mix and 8 mM MgCl<sub>2</sub>), 10 pmol of each primer and 5 pmol fluorescent



**Figure 3** (a) Frequency of CD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> naive (black circles, black line) and CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> memory (white circles, dotted line) cells, expressed as the percent of cells within CD4<sup>+</sup> T cells. Each dot represents one patient ( $n=2-6$ ). Median values are shown as black and dotted lines. (b) TREC counts, expressed as copy number per  $10^6$  GAPDH copies. TREC counts are shown for 18- to 22-year-old controls, HSC donors and their respective recipients at M+7.5 (days 151-300) and M+11 (days 301-365). Median values are shown as black bars.

probe. One cycle of denaturation/enzyme activation (95°C for 10 min) was followed by 50 cycles of amplification (94°C for 30 s, 60°C for 30 s), performed on LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France).

A series of standard dilutions of a plasmid containing the signal-joint breakpoint was used to quantitate TREC in each patient and control DNA sample. Cycle threshold was assessed using the second derivative method with the LightCycler software 3.5.3. Each DNA sample was run in duplicate. Quantification of a reference gene (GAPDH) was carried out in the same conditions with primers and probes as follows: GAPDH1, 5'-GAG ATG GTG CAG AAC CTC AT-3'; primer GAPDH2, 5'-CCA AAT TCA TCG AAA TAG CC-3'; and GAPDH probe, 5'-FAM-CAC CAC AGA GGC CCA AGG TC-TAMRA-3'.

DNA samples were analyzed at M+7.5 and M+11 post transplantation. Results were expressed as the mean of duplicate TREC copies number normalized by GAPDH gene copies number.

#### Chimerism analysis

Chimerism analyses were performed on marrow and peripheral blood nucleated cells at M+2.5, M+7.5 and M+11 post transplantation, as well as on sorted CD3<sup>+</sup> cells. Percentages of donor-host chimerism for recipients were based upon semiquantitative PCR-based amplification of short tandem repeat (STR) sequences unique to donors and hosts.<sup>24</sup> Quantification of chimerism using STR was performed after GeneScan (Applied Biosystem; Courtaboeuf, France) software analysis of the respective fluorescence peak intensity of donors' and recipients' informative STR loci.

#### Statistical analysis

Given the low number of patients included in the study, the cohort of patients was not censored for clinical and biological events that could influence the immunoreconstitution, such as preparative regimen, immunosuppressive regimen, GvHD, relapse or DLI, in order to perform an overall analysis of immunoreconstitution after RIC-PBSCT. Descriptive statistics, log-rank test, paired Student's *t*-test or Wilcoxon's signed rank test (depending on Gaussian or non-Gaussian distribution of values) were performed with SPSS software (SPSS France, Paris, France) or with Sigma Stat software (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Survival curves were analyzed according to Kaplan-Meier method (SPSS France).

## Results

#### Survival and engraftment

Median times to neutrophil reconstitution ( $>500$  neutrophils/ $\mu$ l) and platelet reconstitution ( $>20000$  platelets/ $\mu$ l) were 8 days (0-15) and 12 days (0-18), respectively. At the end of the study, 11 patients were still alive with a median follow-up of 445 days (208-1279); six were in complete response (CR), two in partial response (PR) and three in progressive disease (PD). Relapse occurred at a median time of 210 days (70-280) in four patients out of nine (44%) who were in PR or CR at the time of transplantation, while seven patients out of 11 (64%) who were in PD at the time of transplantation had an uncontrolled disease noticed at a median time of 100 days (20-595). Three patients out of nine (33%) who were in PR or CR at the time of transplantation died at a median time of 480 days (308-507) from GvHD ( $n=1$ ) or relapse ( $n=2$ ) and six patients out of 11 (55%) who were in PD at the time of transplantation died at a median time of 161 days (120-343) from progression of their disease ( $n=3$ ), GvHD ( $n=2$ ) and acute respiratory distress syndrome ( $n=1$ ). No overall survival difference was observed between patients who were in PD and those who were in PR or CR at the time of transplantation (Kaplan-Meier test,  $P=0.131$ ), possibly due to the low number of patients included in this cohort. Acute ( $\geq$  grade II) GvHD occurred among 13 patients (65%) with a median time of 38 days (9-93), while extensive chronic GvHD (cGvHD) occurred in four patients (20%) with a

median time of 142 days (100–160). Chimerism analysis showed that the median percentage of cells from donor origin within sorted CD3+ cells were 89% (14–100%,  $n=18/20$  evaluable patients) (Table 2), 100% (76–100;  $n=12/16$  evaluable patients) and 100% (46–100;  $n=6/13$  evaluable patients) at M+2.5, M+7.5 and M+11, respectively.

#### *Infectious complications*

We observed only two late severe bacterial infections with Gram-negative bacteria: one patient developed *Serratia* bacteremia on day 127 and died on day 128 of progressive lymphoma. The second patient (15) with developed *Pseudomonas* bacteremia on day 135 and died on day 143 in of progressive AML.

Three patients (15%) developed asymptomatic CMV antigenemia without CMV disease on days 30–80 (Table 2). All patients responded to pre-emptive treatment with ganciclovir. Furthermore, no EBV-induced lymphoproliferation was observed.

One patient (16) had a history of invasive pulmonary aspergillosis 4 months before transplantation. On voriconazole prophylaxis, no reactivation was observed after transplantation.

#### *Immune reconstitution*

Median total lymphocyte counts (Figure 1a) increased during the first months post transplant and reached the normal values of healthy controls at 18 months. Median CD3+ cell counts also increased during the first months post transplant and were close to normal values at M+18 (Figure 1b). No patient achieved normal CD4+ cell counts during the study period (Figure 1c), and only 2/12 patients at M+7.5 and 2/5 patients at M+11 had more than 200 CD4+ cells/ $\mu$ l. Median CD8+ cell counts increased early after transplantation and were close to normal values at M+4 (Figure 1d), leading to an inverted CD4/CD8 ratio throughout the study period (data not shown).

CD56+ NK cell reconstitution (Figure 1e) was rapid since the median counts was half normal limit at M+1.5, with 5/17 patients having normal counts at this time and median counts were within normal range at M+18. Median CD19+ B-cell counts (Figure 1f) reached normal values at M+11 and further increased at M+18.

#### *Reconstitution of activated and naïve CD8+ T cells*

Activated CD8+ cells were monitored following RIC-PBSCT using two cell surface activation markers: CD57 and HLA-DR. Median CD8+ /CD57+ (Figure 2a) as well as CD8+ /HLA-DR+ (Figure 2b) cell counts were normalized at M+1.5 and persisted within normal range, or were even over-represented, throughout the study period. The repartition of naïve (CD45RA+/CD27+), early memory (CD45RA-/CD27+), late memory (CD45RA-/CD27-) and effector (CD45RA+/CD27-) CD8+ T cells was analyzed using four-color flow cytometry. CD8+ T cells expressed mainly a naïve

(Figure 2c), early memory (Figure 2c) or effector phenotype (Figure 2d), while late memory cells were poorly represented (Figure 2d). We further analyzed the expression of CD28 within naïve, memory and effector cells. We observed that, while naïve cells are expected to be >80% CD28+,<sup>25</sup> the median percentage of CD28 expression by such cells is low (20–50%) in transplanted patients and is even below the CD28 expression level of early memory cells (50–70%; Figure 2e). As expected,<sup>25</sup> CD27-/CD8+ (late memory and effector) T cells did not express the CD28 marker (data not shown).

#### *Analysis of the thymic-dependent CD4+ T-cell recovery*

As shown in Figure 1c, CD4+ T-cell recovery occurred late after transplantation. The repartition of naïve and memory CD4+ T cells was analyzed according to the expression of the CD45RA and CD45RO markers. Throughout the study, naïve (CD45RA+/CD45RO-) CD4+ T cells were almost undetectable, while usually more than 80% of cells exhibited a CD45RA-/CD45RO+ memory phenotype, with the remaining cells being CD45RA+/CD45RO+ intermediate (recently activated) CD4+ T cells (Figure 3a). We quantified the TREC contents within PBMC of 16 patients (median age: 53 (29–65) years) at M+7.5 and also, for nine of these 16 patients at M+11, that is, at a time of expected complete donor chimerism, and compared them to the TREC contents of 19 HSC donors (median age: 50 (27–66) years). Cells from 20 young adults (median age: 19 (18–22) years) were used as a positive control for TREC contents and had similar contents (median: 99.2 copies/ $10^6$  GAPDH copies) as HSC donors (median: 81.4 copies/ $10^6$  GAPDH copies). As shown Figure 3b, the TREC content in patients' PBMC was lower at M+7.5 (median: 21.5 copies/ $10^6$  GAPDH copies,  $n=16$ ), and even more at 11 months (median: 5.9 copies/ $10^6$  GAPDH copies,  $n=9$ ), than in the HSC donors (median: 81.4 copies/ $10^6$  GAPDH copies,  $n=19$ ). The difference was significant when comparing recipients with their respective donors ( $P=0.034$  at M+7.5,  $n=16$ ;  $P=0.004$  at M+11,  $n=9$ ; Wilcoxon's signed rank test). Linear regressions revealed no correlation between TREC content and donor or recipient age, number of infused CD34+ cells or percent donor chimerism at M+7.5 or +11 (data not shown) and no association was found between TREC content and GvHD occurrence or DLI administration (Student's *t*-test; data not shown).

#### **Discussion**

Immune recovery after HSC transplantation is a dynamic process, modulated or influenced by various clinical factors such as GvHD occurrence or the age of the patient,<sup>26,27</sup> and treatment-related factors such as immunosuppressive regimen or DLI. We studied the immune reconstitution after RIC-PBSCT in a group of patients homogeneous in age and type of hematopoietic stem cells, two factors possibly affecting T-cell recovery. Pathology and pre- and post transplant regimen were heterogeneous, as the study was

retrospectively conducted in all patients transplanted between November 1999 and May 2003.

The quantification of the episomal DNA by-products of thymic TCR rearrangement (termed TREC) is an available and accurate measure of thymic-dependent T-cell lymphopoiesis,<sup>28</sup> which has been correlated with the frequency of naïve CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> cells. We measured recipients' TREC levels between M+7.5 and M+11 after RIC-PBSCT, as chimerism during the same period was almost complete in our series, thus allowing an easier analysis of donor thymopoiesis. We observed a profound and prolonged CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> lymphopenia after RIC-PBSCT, which is emphasized by low naïve CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> T-cell counts and low TREC levels. The predominant circulating CD4<sup>+</sup> T cells exhibited a memory CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup> phenotype with the remaining cells expressing a CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> intermediate phenotype that has been associated with recently activated cells.<sup>30</sup> These memory and intermediate phenotypes suggest that most cells were recently activated and/or may result from peripheral expansion of infused donor T cells. It is possible that the reduction of median TREC levels observed between M+7.5 and M+11 could be due to the low number of patients, but we can also hypothesize that this reduction may result either from activation-induced cell death of naïve cells or, more probably, from dilution of the TREC-positive cells, through peripheral naïve T-cell division.<sup>31</sup> This result is in line with data from Bahceci *et al*,<sup>32</sup> who observed a progressive decrease of TREC contents from day 14 to day 180 after RIC-PBSCT and concluded that early reconstitution resulted from post-thymic T-cell expansion. Our data further suggest that recent thymic emigrants may enter a peripheral expansion that would be added to the initial peripheral expansion of infused T cells.

In accordance with other studies,<sup>17,33</sup> CD8 T cells normalized rapidly during the first months post transplantation as well. Most of the CD8<sup>+</sup> T cells were early memory CD8<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup> effectors T cells. These CD8<sup>+</sup> T cell subsets are described to be consecutive to clonal peripheral antigen-induced expansion.<sup>34</sup> A high frequency of cells also exhibited a CD8<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> phenotype corresponding to naïve CD8<sup>+</sup> T cells. This subset, supposed to be CD28<sup>+</sup>,<sup>25</sup> expressed unexpectedly low levels of CD28, suggesting that these so-called naïve T cells may have entered an activation and/or differentiation process. We found rapid normalization or even overexpression of activated CD8<sup>+</sup> cells expressing CD57 or HLA-DR in the first months post transplantation. Early CD8<sup>+</sup> T-cell restoration led to a reversed CD4/CD8 ratio after RIC-PBSCT and may result from an initial expansion of transferred or residual CD8<sup>+</sup> T cells, as described by Rowbottom *et al*.<sup>35</sup> Biological activity of CD8<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup> cells is unclear, but is supposed to contain anti-CMV cytotoxic T cells.<sup>35,36</sup> CD8<sup>High</sup>/CD57<sup>+</sup> T cells arise from peripheral expansion and contribute to the oligoclonal antigen-dependent repertoire, while CD8<sup>Low</sup>/CD57<sup>+</sup> are corresponding to NK cells, a cell subset also rapidly reconstituted in our study as usually observed after

HSCT.<sup>27</sup> In agreement with previous studies,<sup>20,37,38</sup> we observed rapid NK cell reconstitution, since the median CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> cell counts were close to the normal values as soon as M+1.5.

In our study, CD19<sup>+</sup> B cells seem to reconstitute more rapidly than CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast to three studies<sup>20,37,38</sup> reporting B-cell reconstitutions (with similar kinetics as our study, that is, low B-cell counts until M+7.5 and normal values reached thereafter, 1 year after transplantation) in a context of early high CD4 T-cell counts, we noticed B-cell reconstitution despite long-lasting low CD4 T-cell counts. Low CD4 (helper) T-cell counts may lead to a weaker T-B cooperation and contribute to the lower extensive cGvHD incidence in our study than in these three studies.

Since both NK and B cells are also involved in the control of viral infections, their rapid reconstitution may contribute to a protective effect against viral reactivations after RIC-HSCT. Overall infectious complication rate in our group is very low compared to other studies investigating RIC-HSCT.<sup>8,39,40</sup> This may be due to the fact that our study was retrospectively conducted and that some infections may not have been documented and may have been treated at home by *per os* antibiotherapy. Despite a high rate of acute GvHD (60%) requiring corticosteroids and increasing the fungal infection risk, no invasive fungal infection (IFI) was observed in our series even in the case of patient 16, who had a previous IFI history. Hagen *et al*<sup>8</sup> have described 32% of IFIs (the majority being aspergillus infections), mainly after day 100, in RIC-PBSCT recipients at high risk for IFIs requiring high-dose corticosteroids. These data were at variance with other studies in the setting of RIC-HSCT.<sup>40</sup> The low number of infections in our cohort could result from the low occurrence of extensive cGvHD and, therefore, from a low need for prolonged steroid treatment. In a similar way, we observed only three patients with asymptomatic CMV antigenemia (15%) and no CMV disease. Moreover, these viral complications occurred early after RIC-PBSCT (before day 100). We observed similar incidence of CMV antigenemia (20.9%) and/or positive serum CMV PCR with a similar median time of incidence (60 days; range: 23–152) after conventional bone marrow transplantation during the same period of follow-up. Studies on CMV reactivation after RIC-HSCT described more frequent CMV antigenemia (40%<sup>44</sup> to 65%<sup>45</sup>). The use of PBSC as a graft source,<sup>41</sup> as in our study, and a rapid reconstitution of CD8<sup>+</sup> T cells, especially CMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells circulating within the first 3 months post transplant,<sup>42</sup> are two factors known to reduce the cumulative incidence of CMV positive antigenemia as compared with RIC-bone marrow transplantation.

In conclusion, our study suggests large peripheral T-cell expansion may compensate for a late thymic-dependent lymphopoiesis. Peripheral T-cell expansion and efficient NK and B-cell reconstitutions may contribute, with other factors such as careful anti-infectious prophylaxis and low incidence of cGvHD, to limit the severe infections, whose incidence was low in our series of RIC-PBSCT-transplanted patients. However, given the low cohort analyzed in our study, further studies on larger series and longer follow-up periods are required to confirm these results.

## Acknowledgements

We are indebted to all the clinical staff of the Bone Marrow Transplantation Unit of the Department of Hematology and the technical staff of the Immunology and Molecular Biology laboratories of the EFS Bourgogne/Franche-Comté for their help and their contribution to this work. This study was supported by grants from the associations 'Cent pour Sang la Vie' and 'Moelle Partage et Vie'.

## References

- 1 Storb RF, Champlin R, Riddell SR *et al*. Non-myeloablative transplants for malignant disease. *Hematology* 2001; **91**: 375–391.
- 2 Feinstein L, Storb R. Nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Oncol* 2001; **13**: 95–100.
- 3 Slavin S, Nagler A, Naparstek E *et al*. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998; **91**: 756–763.
- 4 Badros A, Barlogie B, Morris C *et al*. High response rate in refractory and poor-risk multiple myeloma after allotransplantation using a nonmyeloablative conditioning regimen and donor lymphocyte infusions. *Blood* 2001; **97**: 2574–2579.
- 5 Childs R, Clave E, Contentin N *et al*. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes allo-immune responses. *Blood* 1999; **94**: 3234–3241.
- 6 Junghanss C, Marr KA. Infectious risks and outcomes after stem cell transplantation: are nonmyeloablative transplants changing the picture? *Curr Opin Infect Dis* 2002; **15**: 347–353.
- 7 Junghanss C, Marr KA, Carter RA *et al*. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**: 512–520.
- 8 Hagen EA, Stern H, Porter D *et al*. High rate of invasive fungal infections following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 9–15.
- 9 Ljungman P. Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; **21** (Suppl. 2): S72–S74.
- 10 Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004; **103**: 2003–2008.
- 11 Junghanss C, Boeckh M, Carter RA *et al*. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002; **99**: 1978–1985.
- 12 Storek J, Gooley T, Witherspoon RP *et al*. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4T cell counts. *Am J Hematol* 1997; **54**: 131–138.
- 13 Mackall CL, Granger L, Sheard MA *et al*. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993; **82**: 2585–2594.
- 14 Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant* 1995; **16**: 413–425.
- 15 Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA *et al*. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 1998; **92**: 4464–4471.
- 16 Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE *et al*. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; **97**: 1458–1466.
- 17 Storek J, Dawson MA, Storer B *et al*. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; **97**: 3380–3389.
- 18 Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM *et al*. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; **95**: 3702–3709.
- 19 Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B *et al*. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996; **88**: 2775–2779.
- 20 Petersen SL, Ryder LP, Bjork P *et al*. 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**: 65–72.
- 21 Boeckh M, Gooley TA, Myerson D *et al*. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996; **88**: 4063–4071.
- 22 Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B *et al*. Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 7–14.
- 23 Douek DC, Vescio RA, Betts MR *et al*. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 2000; **355**: 1875–1881.
- 24 Thiede C, Florek M, Bornhauser M *et al*. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 1999; **23**: 1055–1060.
- 25 Hamann D, Baars PA, Rep MHG *et al*. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997; **186**: 1407–1418.
- 26 Storek J, Joseph A, Dawson MA *et al*. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2002; **73**: 1154–1158.
- 27 Fallen PR, McGreavey L, Madrigal JA *et al*. Factors affecting reconstitution of the T cell compartment in allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2003; **32**: 1001–1014.
- 28 Kong FK, Chen CL, Six A *et al*. T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 1536–1540.
- 29 Heitger A, Neu N, Kern H *et al*. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; **90**: 850–857.
- 30 Johannisson A, Festin R. Phenotype transition of CD4+ T cells from CD45RA to CD45RO is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 1995; **19**: 343–352.

- 31 Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ *et al*. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003; **4**: 97–99.
- 32 Bahceci E, Epperson D, Douek D *et al*. Early reconstitution of the T-cell repertoire after non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation is from post-thymic T-cell expansion and is unaffected by graft-versus-host disease of mixed chimerism. *Br J Haematol* 2003; **122**: 934–943.
- 33 Mohty M, Gaugler B, Faucher C *et al*. Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology* 2002; **7**: 157–164.
- 34 Hamann D, Kostense S, Wolthers KC *et al*. Evidence that human CD8+ CD45RA+ CD27– cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* 1999; **11**: 1027–1033.
- 35 Rowbottom AW, Garland RJ, Lepper MW *et al*. Functional analysis of the CD8+ CD57+ cell population in normal healthy individuals and matched unrelated T-cell-depleted bone marrow transplant recipients. *Br J Haematol* 2000; **110**: 315–321.
- 36 Wang EC, Borysiewicz LK. The role of CD8+, CD57+ cells in human cytomegalovirus and other viral infections. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995; **99**: 69–77.
- 37 Maris M, Boeckh M, Storer B *et al*. Immunologic recovery after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Exp Hematol* 2003; **31**: 941–952.
- 38 Busca A, Lovisone E, Aliberti S *et al*. Immune reconstitution and early infectious complications following nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology* 2003; **8**: 303–311.
- 39 Mohty M, Jacot W, Faucher C *et al*. Infectious complications following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with antithymocyte globulin-based reduced intensity preparative regimen. *Leukemia* 2003; **17**: 2168–2177.
- 40 Mossad SB, Avery RK, Longworth DL *et al*. Infectious complications within the first year after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 491–495.
- 41 Mohty M, Faucher C, Vey N *et al*. High rate of secondary viral and bacterial infections in patients undergoing allogeneic bone marrow mini-transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 251–255.
- 42 Mohty M, Mohty AM, Blaise D *et al*. Cytomegalovirus-specific immune recovery following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with reduced-intensity preparative regimen. *Bone Marrow Transplant* 2004; **33**: 839–846.

**PERMIS D'IMPRIMER**

*THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT*

*DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE*

*EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° 25/08/11

Présentée par Madame, ~~Monsieur~~ Caroline MARMIER - SAUET  
Né(e) le 13 mai 1978.

et ayant pour titre : Etude de l'impact de la mobilisation des Cellules  
Souches Périphériques (CSP) mobilisées par le facteur de croissance  
des granulocytes (G-CSF) sur les donneurs sains et les receveurs  
après allogreffe de CSP à conditionnement non myelo-ablatif.

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le 25/02/08.

Le Directeur de Thèse,  
Eric ROBINET

*Robinet*

Le Président de l'Université  
et par délégation,  
Le Doyen,

Pr SAMAIN.

