

Mémoire de DES  
Hématologie – option maladies du sang

# **POLYMORPHISMES NON-HLA ET EVOLUTION POST-ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES**

Présenté le 2 octobre 2009 par

Aurore Perrot  
née le 08/08/1979

Jury : Pr HERBRECHT  
Pr DECONINCK  
Pr BASTIE  
Pr BORDIGONI  
Pr LECOMPTE  
Pr FEUGIER  
Pr DELMER



Je remercie vivement le Pr Pierre Bordigoni pour m'avoir confié ce travail,  
le Dr Alexandra Salmon pour son aide notamment dans le recueil des données,  
Mme Sylvie Tarillon pour l'organisation des prélèvements,  
et l'ensemble du personnel médical et paramédical des services d'Hématologie et de  
Transplantation Médullaire où ont été pris en charge les patients de cette étude.

Je remercie le Dr Farès Namour et le Pr Jean-Louis Guéant pour avoir pensé cette étude,  
et avoir réalisé les analyses de biologie moléculaire,  
ainsi que Bernard Herbeth pour son expertise statistique.

Je remercie enfin le Dr Nathalie Dhédin et le Pr Jean-Paul Vernant de l'hôpital Pitié-  
Salpêtrière, ainsi que le Pr Gérard Socié de l'hôpital St-Louis,  
pour leur intérêt pour cette étude, leurs remarques et leurs conseils avisés.

## ABREVIATIONS

<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>MMR</b> : <i>Macrophage Mannose Receptor</i>
<b>CARD</b> : <i>CAspase Recruitment Domain</i>	<b>MTX</b> : Méthotrexate
<b>CCL</b> : <i>Chemokine CC motif Ligand</i>	<b>NK</b> (cellules) : <i>Natural Killer</i>
<b>CCR</b> : <i>Chemokine CC motif Receptor</i>	<b>NLR</b> : <i>NOD-Like Receptors</i>
<b>CD</b> : Cluster de Différentiation (CD-4 : cluster de différenciation 4)	<b>NOD</b> : <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
<b>CLR</b> : <i>C-type lectin-like receptors</i>	<b>OR</b> : <i>Odds Ratio</i>
<b>CMH</b> : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>OS</b> : <i>Overall Survival</i>
<b>CPA</b> : Cellules Présentatrices d'Antigène	<b>PAMPs</b> : <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
<b>CRP</b> : <i>C-reactive protein</i>	<b>PCR</b> : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>CSA</b> : Ciclosporine	<b>PHRC</b> : Programme Hospitalier de Recherche Clinique
<b>CSH</b> : Cellules Souches Hématopoïétiques	<b>PRR</b> : <i>Pattern-Recognition Receptors</i>
<b>CSP</b> : Cellules Souches Périphériques	<b>RFLP</b> : <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>CXCR</b> : <i>Chemokine CXC motif Receptor</i>	<b>RIC</b> : <i>Reduced-Intensity Conditioning</i>
<b>DFS</b> : <i>Disease Free Survival</i>	<b>RIG</b> : <i>Retinoic acid Inducible Gene</i>
<b>EDTA</b> : Ethylène Diamine Tétra Acétique	<b>RLH</b> : <i>RIG-I-Like Helicases</i>
<b>FRET</b> : <i>Fluorescent Resonance Energy Transfert</i>	<b>SAL</b> : Sérum Anti-Lymphocytaire
<b>GPI</b> : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol	<b>SNP</b> : <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>GvH</b> (réaction) : <i>Graft versus Host</i>	<b>STR</b> : <i>Short Tandem Repeats</i>
<b>GvHa / GvHc</b> : GvH aiguë / GvH chronique	<b>Th1</b> (lymphocytes) / <b>Th2</b> (lymphocytes) : <i>T helpers 1 / T helpers 2</i>
<b>GvL</b> (effet) : <i>Graft versus Leukemia</i>	<b>TGF-β</b> : <i>Transforming Growth Factor bêta</i>
<b>HLA</b> : <i>Human Leukocyte Antigen</i>	<b>TLR</b> : <i>Toll-like receptors</i>
<b>IFN-γ</b> : Interféron gamma	<b>Tm</b> : Température de fusion
<b>ICT</b> : Irradiation Corporelle Totale	<b>TRM</b> : <i>Treatment-Related Mortality</i> (mortalité liée à la procédure)
<b>IL</b> : Interleukine (IL-1 : interleukine 1...)	<b>TNF-α</b> : <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
<b>LAL</b> : Leucémie Aiguë Lymphoblastique	<b>VNTR</b> : <i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
<b>LAM</b> : Leucémie Aiguë Myéloblastique	<b>WT</b> : <i>Wild Type</i> (Allèle sauvage)
<b>LMC</b> : Leucémie Myéloïde Chronique	
<b>LPS</b> : Lipopolysaccharide	
<b>LRR</b> (region) : <i>Leucine-Rich Repeats</i>	
<b>LT / LB</b> : lymphocytes T / lymphocytes B	
<b>MAP-kinase</b> : <i>Mitogen-activated protein kinase</i>	
<b>MBL</b> : <i>Mannan-Binding Lectin</i>	
<b>MDP</b> : Muramyl DiPeptide	
<b>MIF</b> : <i>Macrophage migration Inhibitory Factor</i>	
<b>MMF</b> : Mycophénolate Mofétil (CELLCEPT®)	

## TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
I.A. ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES	3
I.A.1. Contexte	3
I.A.2. Physiopathologie de la GvH	4
I.A.3. Mécanismes d'autres processus post-allogreffe	6
I.B. POLYMORPHISMES NON HLA	6
I.B.1. Polymorphismes de gènes codant pour des cytokines	7
I.B.2. Polymorphismes de gènes codant pour des molécules de l'immunité innée	11
I.B.3. Autres polymorphismes de gènes influençant l'évolution post-greffe	14
<b>II. OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>16</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>17</b>
II.A. COUPLES DONNEURS / RECEVEURS	17
II.B. PROCEDURES DE TRAITEMENT	17
II.C. GENOTYPAGE DES POLYMORPHISMES	19
II.D. ANALYSE STATISTIQUE	21
<b>III. RESULTATS</b>	<b>22</b>
III.A. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE	22
III.B. FREQUENCE DES POLYMORPHISMES	23
III.B.1. Fréquence des SNP de NOD2/CARD15	23
III.B.2. Fréquence des polymorphismes des gènes des cytokines	24
III.C. IMPACT DES POLYMORPHISMES SUR L'INCIDENCE DE LA GVH AIGUË	25
III.C.1. Impact des SNP de NOD2/CARD15	25
III.C.2. Impact des polymorphismes des gènes des cytokines	25
III.D. IMPACT DES POLYMORPHISMES SUR L'INCIDENCE DE LA GVH CHRONIQUE	26
III.D.1. Impact des SNP de NOD2/CARD15	26
III.D.2. Impact des polymorphismes des gènes des cytokines	26
III.E. IMPACT DES POLYMORPHISMES SUR LES AUTRES COMPLICATIONS POST-GREFFE	27
III.F. INTERET DE L'IMPACT DU SNP 8 DE NOD2 SUR L'EVOLUTION POST-GREFFE	28
III.F.1. Analyse multivariée	28
III.F.2. Sous-analyse de la population pédiatrique	28
<b>IV. DISCUSSION – PERSPECTIVES</b>	<b>30</b>
<b>V. REFERENCES</b>	<b>32</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Physiopathologie de la GvH aiguë selon Ferrara. _____	4
Figure 2 : Localisation cellulaire des principaux <i>Pattern Recognition Receptors</i> . _____	11
Figure 3 : Signalisation en aval de NOD2 et TLR2. _____	12
Figure 4 : Mutations et polymorphismes de <i>NOD2</i> . _____	12
Tableau 1 : Impact des polymorphismes de <i>NOD2</i> sur l'évolution post-allogreffe de CSH - synthèse de la littérature. _____	13
Tableau 2 : Détermination allélique des SNP de <i>NOD2</i> selon la température de fusion. _____	19
Tableau 3 : Détermination allélique des SNP IL-6 <sup>-174</sup> G/C et IL-10 <sup>-592</sup> C/A selon la température de fusion. _____	20
Tableau 4 : Détermination des allèles d'IL-1Ra selon le nombre de répétitions VNTR. _____	21
Tableau 5 : Caractéristiques des couples donneurs / receveurs. _____	22
Tableau 6 : Fréquence des polymorphismes de <i>NOD2</i> chez le donneur et le receveur. _____	23
Tableau 7 : Fréquence des polymorphismes IL-6 <sup>-174</sup> G/C, IL-10 <sup>-592</sup> C/A et VNTR (allèle 2) IL-1Ra. _____	24
Tableau 8 : Impact du SNP8 de <i>NOD2</i> sur l'incidence de la GvH aiguë. _____	25
Tableau 9 : Impact du SNP8 de <i>NOD2</i> sur l'incidence de la GvH chronique. _____	26
Tableau 10 : Impact pronostique de la présence chez le donneur du SNP8 de <i>NOD2</i> en analyse multivariée. _____	28
Tableau 11 : Fréquence des SNP de <i>NOD2</i> dans la population pédiatrique. _____	29
Tableau 12 : Impact d'un SNP 8 chez le donneur dans la population pédiatrique. _____	29

## I. INTRODUCTION

### I.A. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

#### I.A.1. Contexte

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est à l'heure actuelle le traitement de choix de certaines hémopathies malignes (leucémies aiguës principalement) mais aussi de pathologies hématologiques bénignes telles que l'aplasie médullaire, les hémoglobinopathies, les déficits immunitaires et certaines maladies métaboliques.

Certains facteurs influençant l'évolution post-allogreffe sont désormais bien connus, tels l'âge du receveur, le type et le statut de la maladie lors de la greffe, ainsi que les comorbidités. Dès les premières greffes réalisées, a été observée cliniquement chez la majorité des patients une réaction immunologique du donneur contre le receveur qui a été appelée '*Graft versus Host Disease*' (GvH) (maladie du greffon contre l'hôte). Cette réaction immunitaire peut être à l'origine de complications majeures après une allogreffe, potentiellement létales, mais s'associe aussi généralement à une action anti-tumorale appelée '*Graft versus Leukemia*' (effet GvL).

L'indication de greffe de moelle allogénique reste en pratique clinique quotidienne un exercice difficile. En effet, il faut estimer de manière la plus objective possible, pour un patient donné, le risque lié à la procédure d'une part, et le risque de l'histoire naturelle de la maladie d'autre part. Le but est d'obtenir l'effet immunologique recherché (activité anti-tumorale dans les hémopathies malignes) avec le moins de toxicité possible à moyen et long terme.

Si la toxicité liée au conditionnement et les infections potentielles entraînent une morbidité et une mortalité non négligeables, la complication la plus fréquente après une allogreffe est représentée par la GvH. Elle est liée à la greffe de cellules immunocompétentes chez un hôte qui possède des antigènes mineurs ou majeurs d'histocompatibilité différents de ceux du donneur (interactions entre des cellules présentatrices d'antigène du receveur et cellules T matures du donneur). Elle est observée presque constamment dans les greffes HLA incompatibles, plus rarement dans les greffes non apparentées HLA identiques et après greffe de moelle apparentée géno-identique. Mais elle peut aussi survenir malgré une prophylaxie immunosuppressive 'intensive' même si le donneur est parfaitement compatible sur le plan HLA. C'est pour cette raison qu'il est suspecté l'intervention d'autres facteurs dans la genèse de la GvH et que de nombreuses études sont réalisées dans le but de déterminer des facteurs pré-greffe prédictifs de l'évolution. Récemment, le séquençage du génome humain a mis en évidence l'existence de polymorphismes de gènes pouvant moduler le phénotype individuel et dans le contexte immunologique de la greffe et de la GvH, ce sont les gènes codant pour des molécules de l'immunité innée ou des cytokines qui sont apparus les meilleurs candidats.

## I.A.2. Physiopathologie de la GvH

Selon le modèle physiopathologique de Ferrara<sup>1</sup>, la réaction du greffon contre l'hôte aiguë est un processus en trois étapes, schématisé à la figure 1.

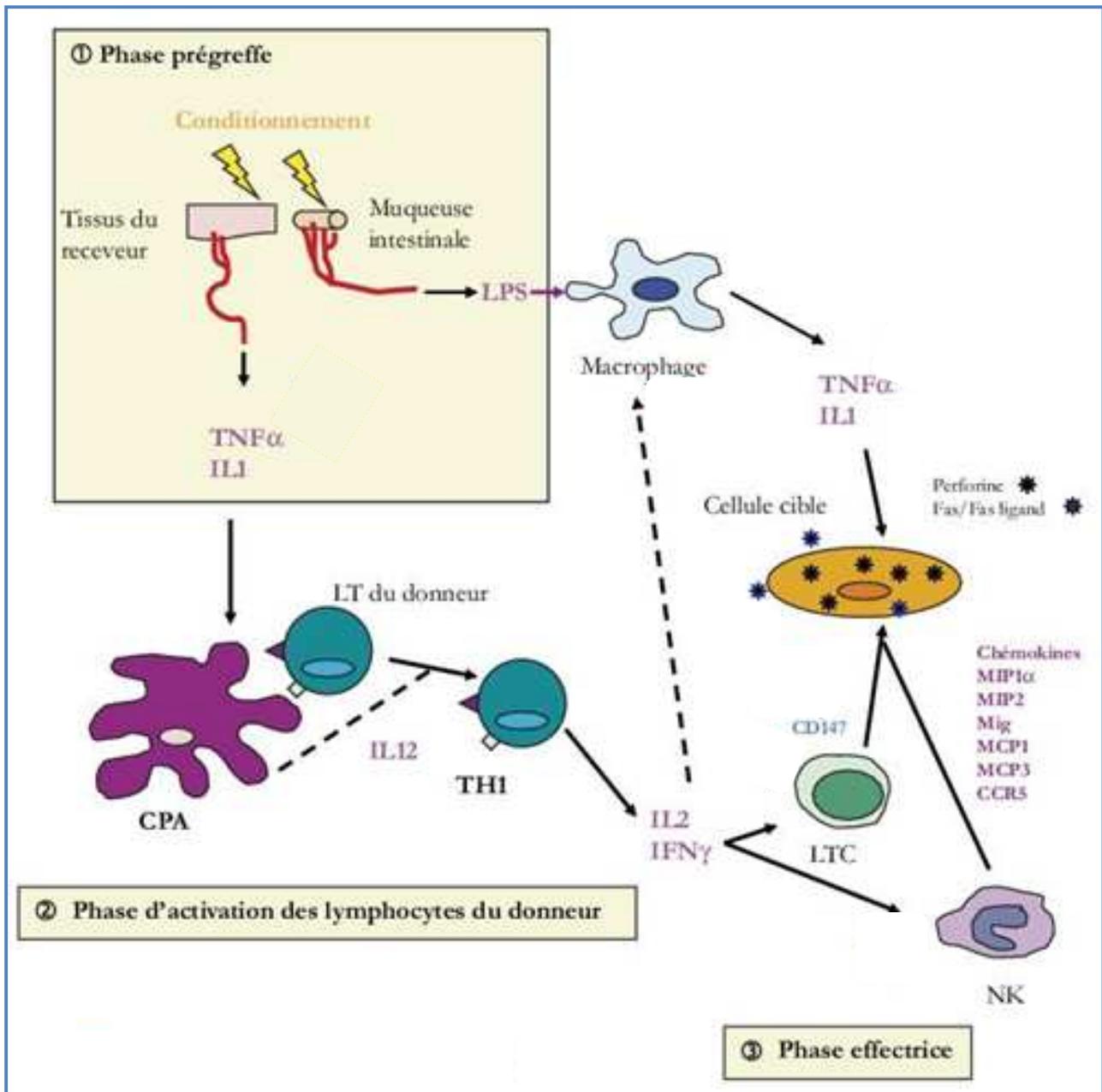


Figure 1 : Physiopathologie de la GvH aiguë selon Ferrara (d'après<sup>2</sup>).

- La 1<sup>ère</sup> étape dans la survenue d'une GvH est secondaire à la production de cytokines et la formation de lésions des tissus épithéliaux sous l'action du conditionnement pré-greffe par chimio- et/ou radiothérapie (notamment l'irradiation corporelle totale). Le relargage de cytokines pro-inflammatoires, avant tout le  $TNF-\alpha$ , l' $IL-1$  et l' $IL-6$ , est à l'origine d'une augmentation de l'expression des antigènes du système HLA et des molécules d'adhésion qui favorise la reconnaissance des antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité par les cellules T matures du greffon<sup>3,4</sup>.

- La 2<sup>ème</sup> phase est une étape d'activation des lymphocytes T (LT) après contact avec les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), notamment les cellules dendritiques, conduisant à une prolifération cellulaire des LT. Le profil de ces LT est de type Th1 avec sécrétion d'IL-2 (cytokine pro-inflammatoire) et d'IFN- $\gamma$ , qui a un rôle immunomodulateur à la fois dans les réponses innées et adaptatives ainsi que dans la régulation de l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale. L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  entraînent également une expansion des LT, induisant une réponse T cytotoxique et une réponse NK et enfin, ils arment le macrophage et le préparent à produire de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$ <sup>5</sup>. La physiopathologie complexe de la GvH dépend fondamentalement des interactions entre les CPA du receveur et les LT matures du donneur. Physiologiquement, l'IL-10, sécrétée par les CPA, facilite le développement d'une tolérance immunologique et diminue la production des cytokines pro-inflammatoires, d'où une minimisation de l'activation des LT du donneur (mécanisme 'régulateur')<sup>6</sup>. Le TGF- $\beta$  (cytokine immuno-régulatrice)<sup>7</sup> et l'IL-13 (cytokine de type Th2 qui diminue la fonction macrophagique et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires)<sup>8</sup>, ainsi que des chimiokines interviennent aussi à cette étape.

Les chimiokines sont des cytokines chimio-attractantes qui jouent un rôle fondamental dans la migration cellulaire et interviennent dans les réponses immunitaires. Dans la GvH, elles induisent la migration des lymphocytes T vers les organes cibles<sup>9</sup>, qui constitue le 4<sup>ème</sup> critère de la classification révisée de Billingham définissant les critères nécessaires pour la survenue d'une GvH<sup>10</sup>.

- La 3<sup>ème</sup> phase est celle des mécanismes inflammatoires de la phase effectrice avec induction de la mort cellulaire par les LT cytotoxiques, induisant l'apoptose des tissus cibles. Cette mort par apoptose est directement liée à l'action du système monocytaire-macrophagique, ou à la sécrétion *in situ* de TNF- $\alpha$  et d'IL-1. Interviennent à cette étape l'IL-18 qui induit la sécrétion de cytokines Th1 en présence d'IL-12 et augmente les réponses Th2 en son absence<sup>11</sup>, et le système Fas / Fas-ligand. Fas appartient aux récepteurs à domaines de mort ; la mort cellulaire par apoptose médiée par Fas est une importante voie de destruction tissulaire dans la GvH, notamment hépatique<sup>12</sup>.

La maladie chronique du greffon contre l'hôte (GvHc) est la cause majeure de mortalité non liée à la rechute et de morbidité après greffe de CSH. Elle est aussi associée à un puissant effet anti-tumoral (effet GvL) et par conséquent un risque de rechute de la maladie maligne diminué. Malheureusement, peu de progrès ont été réalisés ces dernières années dans la compréhension de sa physiopathologie. Ceci est en grande partie lié au fait qu'il n'existe pas de modèle animal satisfaisant pour décrire la GvHc. Dans deux modèles classiques mimant cependant plus l'atteinte rénale du lupus érythémateux disséminé ou la sclérodémie systémique que les éléments de la GvHc humaine, le rôle du TGF- $\beta$  est bien mis en exergue dans le développement de la fibrose terminale. De plus, les inter-relations entre les lymphocytes B (LB) et les LT dans la genèse des lésions tissulaires sont bien décrites, et un certain nombre de travaux suggère qu'un des mécanismes physiopathologiques majeurs dans la GvHc est un défaut de coopération entre les LB et les LT<sup>13</sup>.

### I.A.3. Mécanismes d'autres processus post-allogreffe

L'évolution post-allogreffe dépend également de la reconstitution immunitaire et de la tolérance des différentes thérapeutiques (chimiothérapies, agents immunosuppresseurs utilisés en prophylaxie ou en traitement curatif de la GvH, anti-infectieux...).

La reconstitution immunitaire après greffe de CSH est lente, exposant les patients à des risques infectieux et tumoraux. La régénération T a été la plus étudiée et provient chez l'adulte de l'expansion des LT matures du greffon ou de l'hôte mais aussi et surtout de la différenciation/maturation des progéniteurs réinjectés. L'immunosuppression est majorée en situation allogénique par l'existence d'un conflit immunitaire et par l'utilisation d'immunosuppresseurs. Les molécules pouvant jouer un rôle dans la reconstitution immunitaire sont l'IL-7<sup>14</sup>, les récepteurs des stéroïdes<sup>15</sup> ou de la vitamine D : l'IL-7 joue un rôle fondamental dans la thymopoïèse, l'homéostasie lymphocytaire T CD4 et CD8 et la survie cellulaire, grâce à une signalisation *via* son récepteur ; les récepteurs des stéroïdes, notamment des œstrogènes et de la vitamine D, ont également été impliqués dans la reconstitution immunitaire post-greffe (effet immunomodulateur de ces voies de signalisation). La voie de la vitamine D jouant aussi un rôle dans le métabolisme de la ciclosporine, un rôle potentiel dans la GvH a été évoqué<sup>16</sup>. Enfin, les progrès de la pharmacogénomique ont mis en évidence que les pharmacogènes, intervenant dans le métabolisme des drogues, pouvaient avoir un rôle dans certaines complications post-allogreffe, telles la cystite hémorragique ou la maladie veino-occlusive<sup>17</sup>.

### I.B. Polymorphismes non HLA

Un polymorphisme génique correspond à une variation de la séquence nucléotidique de l'ADN d'un gène dans une population. Un gène est considéré polymorphe s'il existe au moins deux allèles à une fréquence égale ou supérieure à 1 %. On distingue :

- des **polymorphismes de restriction** (RFLP), découverts en 1978, correspondant à des variations d'ADN abolissant ou créant un site de restriction, entraînant une modification de la taille du ou des fragments obtenus par une enzyme de restriction ; ces RFLP sont actuellement supplantés par des polymorphismes plus informatifs (polymorphismes de répétition ou SNP)

- des **polymorphismes de répétition**, découverts en 1989, composés des mini-satellites ou VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) et des micro-satellites ou STR (*Short Tandem Repeats*) : il s'agit de séquences répétées en tandem au même site, les motifs variant de 10 à 100 nucléotides pour les VNTR et de 1 à 10 pour les STR.

- des **polymorphismes à l'échelle du nucléotide**, les SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), découverts plus récemment en 1998, qui constituent le degré le plus fin dans l'échelle des variations possibles du génome ; il s'agit souvent de substitutions ne concernant qu'une base nucléotidique, une faible proportion étant composée de micro-délétions ou insertions portant sur quelques nucléotides.

Chez l'homme, on estime le nombre de polymorphismes géniques à plus de 10 millions. Dans la plupart des cas, ces polymorphismes, malgré les variations qu'ils provoquent, ne sont pas fonctionnels. Mais dans certains cas, ils peuvent prédisposer ou être associés à certaines pathologies, en modifiant par exemple le niveau de production ou la fonction de la protéine codée par ce gène. Dans le contexte immunologique de la greffe de CSH, de nombreuses études se sont intéressées aux polymorphismes de gènes codant pour des cytokines, des molécules de l'immunité innée ou plus récemment de pharmacogènes<sup>18</sup>.

### I.B.1. Polymorphismes de gènes codant pour des cytokines

Ici sont présentés les polymorphismes de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6), anti-inflammatoires (IL-10, IL-13), et immunorégulatrices (IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-18) ainsi que pour des chimiokines dont un rôle a été décrit dans l'évolution post-allogreffe de CSH.

#### CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES

##### - Polymorphismes des gènes codant pour le TNF- $\alpha$ et son récepteur

Dans le gène du TNF- $\alpha$ , situé sur le chromosome 6 dans la région des molécules du CMH de classe III, ont été décrits des polymorphismes de type séquences microsatellites (répétitions GA). L'allèle le plus fréquent, TNFd3, est associé à une production élevée de TNF- $\alpha$  *in vitro*<sup>19</sup>. L'équipe d'AM Dickinson a montré qu'une homozygotie d3/d3 chez un receveur de greffe de CSH était associée à une augmentation de la sévérité de la GvHa en situation de greffe apparentée avec prophylaxie de la GvH par Ciclosporine seule<sup>20</sup>, et à une augmentation de la mortalité avant J30 (23,7 % vs 6,8 %) en situation apparentée avec prophylaxie par l'association de Ciclosporine et Méthotrexate<sup>21</sup>.

Par ailleurs, une équipe japonaise a montré qu'un polymorphisme de type SNP (allèle 196R) du gène du récepteur de type II (exprimé sur les cellules hématopoïétiques) du TNF (*TNFRII*) était associé, lorsqu'il était porté par le donneur, à une augmentation de la sévérité de la GvHa en situation de greffe non apparentée<sup>22</sup>. L'équipe d'AM Dickinson a ensuite mis en évidence un lien entre ce polymorphisme 196R présent chez le receveur et une augmentation d'incidence de GvHa (association qui persistait en analyse multivariée), ainsi qu'une augmentation de l'incidence de GvHc extensive en cas de donneur homozygote 196R/196R ; ce facteur pronostique était également indépendant en analyse multivariée (OR à 11, p=0,02)<sup>23</sup>.

##### - Polymorphismes des gènes codant pour l'IL-1 et son récepteur IL-1Ra

L'IL-1 est une autre cytokine pro-inflammatoire relarguée *via* les monocytes et les macrophages pendant le conditionnement. Il a été montré dans un modèle de GvH cutanée que l'IL-1 pouvait entraîner des lésions de GvH et que ces lésions pouvaient être inhibées par l'IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*)<sup>24</sup>. Des polymorphismes des gènes de la famille de l'IL-1 ont été décrits et impliqués dans des maladies systémiques et des déficits immunitaires<sup>25</sup>. Plusieurs études se sont intéressées aux répétitions en tandem de taille variable (*VNTR*) du gène de l'IL-1Ra qui est un antagoniste de l'IL-1. L'allèle 2 du gène codant pour IL-1Ra

entraîne une dysfonction de l'antagoniste et une up-régulation de l'IL-1<sup>26</sup>. Dans le contexte de l'allogreffe, cet allèle 2 est associé dans plusieurs études à une augmentation de la GvH aiguë sévère et de la GvH chronique<sup>24,27,28</sup>.

#### - Polymorphismes du gène de l'IL-2

L'IL-2 est une cytokine pro-inflammatoire dérivée des cellules Th1. Un polymorphisme (-330T/G) situé dans la région promotrice du gène est associé à une augmentation de la production d'IL-2<sup>29</sup>. Une étude de 95 couples donneur/receveur en situation de greffe non apparentée montre une association entre ce polymorphisme et une incidence augmentée de GvHa (49 % vs 24 %,  $p < 0,01$ )<sup>30</sup>. Ceci n'a pas été confirmé dans d'autres études, notamment en situation d'allogreffe apparentée, mais un intérêt thérapeutique a déjà été démontré puisque des anticorps anti-récepteur de l'IL-2 (Inolimomab LEUKOTAC®) et anti-CD25 –sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (Daclizumab ZENAPAX®) ont une indication dans le traitement des GvH aiguës cortico-résistantes.

#### - Polymorphismes du gène de l'IL-6

L'IL-6 est une autre cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules B et les cellules mononuclées. Son niveau de production peut dépendre de polymorphismes géniques (notamment de *SNP* situés dans la région promotrice du gène). L'expression de l'allèle -174 G est associée à un plus haut niveau de production d'IL-6<sup>31</sup>. Plusieurs études en situation d'allogreffe familiale ont montré une augmentation de la GvHa et de la GvHc dans le groupe donneur ou receveur muté (allèles GC ou GG)<sup>31-33</sup>.

### CYTOKINES ANTI-INFLAMMATOIRES

#### - Polymorphismes du gène de l'IL-10

L'IL-10 est une cytokine de type Th2 sécrétée dans le contexte de la greffe essentiellement par les cellules présentatrices d'antigène du receveur et les cellules T matures du donneur. Physiologiquement, l'IL-10 facilite le développement d'une tolérance immunologique et diminue la production des cytokines pro-inflammatoires, d'où une minimisation de l'activation des cellules T du donneur et une réduction de la réaction allogénique (pas ou peu de GvH). Le gène de l'IL-10 est hautement polymorphique, avec au moins 5 *SNP* et quelques VNTR, conduisant à la définition de plusieurs haplotypes. Les premières études ont montré que le polymorphisme IL-10<sup>-1064</sup>(CA) correspondant à une faible production d'IL-10 (haplotype ACC) était associé, lorsque présent chez le receveur en situation de greffe apparentée, à une augmentation de l'incidence de GvHa sévère (de grade III et IV)<sup>21,34</sup>. L'équipe de Seattle a confirmé ces résultats en analysant plus de 1000 couples donneur/receveur en situation géno-identique. Lin *et al.* ont montré que le génotype homozygote AA du *SNP* IL-10<sup>-592</sup> était associé à un plus faible risque de GvHa de grade III et IV (9 % vs 15 et 21 % respectivement pour les hétérozygotes AC et les homozygotes CC,  $p = 0,001$ )<sup>6</sup>. La publication de cet article conduisait à un commentaire de Ferrara, dans la même édition du *New England Journal of Medicine*, intitulé 'A Protective Gene for Graft-versus-Host Disease'<sup>35</sup>.

A noter que ce génotype 'favorable' AA, qui a été associé à une augmentation de la production d'IL-10, est retrouvé à une fréquence de 24 % chez les Nords-Américains, vs 70 % chez les Japonais (population réputée pour avoir un taux de GvHa très faible). D'autres études ont également montré une association entre la présence de ces haplotypes du gène de l'IL-10 et l'incidence de GvHa de grade III ou IV<sup>12,33,36,37</sup>.

#### - Polymorphismes du gène de l'IL-13

L'IL-13 est une cytokine de type Th2 qui diminue la fonction macrophagique et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans des modèles murins, la réalisation de greffes avec des donneurs IL-13 -/- entraîne une augmentation de l'incidence de la GvH ainsi que de sa sévérité<sup>8</sup>. L'équipe d'AM Dickinson a travaillé sur des polymorphismes du gène de l'IL-13 montrant que ceux-ci étaient associés à une réduction de la GvH aiguë et de la GvH chronique<sup>38</sup>.

### CYTOKINES IMMUNO-REGULATRICES

#### - Polymorphismes du gène de l'IFN- $\gamma$

L'IFN- $\gamma$  joue un rôle à la fois dans les réponses innées et adaptatives ainsi que dans la régulation de l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale (cytokine immuno-modulatrice). Plusieurs polymorphismes du gène codant pour l'IFN- $\gamma$  ont été décrits : l'allèle 2 est associé à une augmentation de la production d'IFN, l'allèle 3 à une diminution<sup>32</sup>. Des études des polymorphismes du gène de l'IFN ont été réalisées dans le contexte d'allogreffe et l'existence d'un génotype 3/3 homozygote a été montrée associée à un risque augmenté de GvH aiguë et chronique<sup>39,40</sup>. Ceci pourrait avoir un intérêt thérapeutique puisqu'il a été montré chez la souris qu'une administration hebdomadaire d'IFN- $\gamma$  était associée à une diminution de la GvH<sup>41</sup>.

#### - Polymorphismes du gène du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est une cytokine immuno-régulatrice dont le gène a fait l'objet de la description de deux polymorphismes aux positions -800 et -509. Sur le plan fonctionnel, ces polymorphismes sont associés à une plus grande production de TGF- $\beta$ <sup>42</sup>. Le SNP -509 C/T chez le receveur a été associé à une augmentation de la GvHa sévère<sup>7</sup>. D'autres polymorphismes des gènes *TGFB* et *TGFBR* ont été étudiés et ont été montrés associés à une augmentation de l'incidence et de la sévérité de la GvH, à la fois en situation d'allogreffe familiale et non apparentée<sup>43</sup>.

#### - Polymorphismes du gène de l'IL-18

L'IL-18 est une cytokine régulatrice qui induit la sécrétion de cytokines Th1 en présence d'IL-12 et augmente les réponses Th2 en son absence. Le gène de l'IL-18 est concerné par trois polymorphismes au niveau de sa région promotrice et il a été décrit trois haplotypes GCG, CAT et GAT. Dans une étude en situation de greffe non apparentée, l'haplotype GCG a été associé à une diminution de la TRM à J100 et une augmentation de la survie<sup>11</sup>. D'autres études de confirmation sont nécessaires, mais dans un modèle murin a été souligné l'intérêt d'un pré-traitement de donneurs par de l'IL-18, permettant une diminution de la GvH chez les receveurs, sans *a priori* d'altération de l'effet GvL<sup>44</sup>.

## AUTRES CYTOKINES

### - Polymorphismes du gène de l'IL-7

L'IL-7 joue un rôle fondamental dans la thymopoïèse, l'homéostasie lymphocytaire T CD4 et CD8 périphérique et la survie cellulaire, grâce à une signalisation via son récepteur, composé d'une chaîne alpha et d'une chaîne  $\gamma$ . Des polymorphismes de type SNP du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  de ce récepteur ont été décrits ; les conséquences fonctionnelles de ces polymorphismes ne sont pas connues. La substitution +1237 concernant la partie extra-cellulaire du récepteur, il est supposé que le polymorphisme modifie la liaison de l'IL-7 ou l'interaction avec la chaîne  $\gamma$ . Dans une étude danoise, l'impact sur l'évolution post-greffe de 4 polymorphismes du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 a été étudié chez 195 couples D/R soumis à une procédure d'allogreffe. Pour les greffes non apparentées, les génotypes AG ou GG du polymorphisme +1237 du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 sont associés de façon significative à une diminution de la survie globale (55 % vs 80 % à 2 ans) en rapport avec une augmentation de la TRM (30 % à 1 an vs < 5 %) <sup>14</sup>. Il existe une tendance à un allongement de la durée de reconstitution lymphocytaire (> 1 G/L) pour les allèles GG ou AG : 64 vs 38 jours pour les AA. Ce polymorphisme est un facteur de risque indépendant en analyse multivariée pour la TRM. Les auteurs concluent que ce polymorphisme peut altérer l'activité de l'IL-7 et donc la fonction thymique et par conséquent retarde la reconstitution immunitaire, ce qui entraîne une augmentation de la TRM.

### - Polymorphismes des gènes de cytokines chimio-attractantes

Plusieurs couples de chimiokines/récepteurs ont été étudiés et notamment le récepteur CCR5 (Chemokine CC motif receptor 5), CCR2, CCL27/CCR10, CXCR3, CCR6, MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), CCR1/CCL5 (RANTES)...

Puisque le rôle de CCR5 dans la GvH a été évoqué dans un modèle murin (recrutement de LT exprimant CCR5) <sup>45</sup>, une équipe polonaise s'est intéressée à la perte de fonction du récepteur par délétion du gène ( $\Delta$ 32) et a montré que celle-ci était associée à une diminution de la GvH aiguë (31 % vs 50 %,  $p=0,033$ ) <sup>9</sup>.

Une équipe parisienne s'est intéressée au polymorphisme de CX3CR1 puisqu'il avait également été montré, chez la souris, un rôle dans la survenue d'une GvH du couple composé de la Fractalkine CX3CL1 exprimée par des LT CD8, et de son récepteur CX3CR1 sécrété par les cellules endothéliales <sup>46</sup>. Dhédin *et al.* ont étudié les polymorphismes du gène *CX3CR1* chez 99 patients allogreffés dans le service de la Pitié-Salpêtrière en situation apparentée : 20 % des patients étaient hétéro- ou homozygotes pour la mutation I249 et 14 % pour la mutation M280. L'incidence de la GvH cutanée est statistiquement plus faible chez les patients présentant la mutation I249 (24 % vs 48 %,  $p=0,05$ ) ou la mutation M280 (15 % vs 26 %,  $p=0,04$ ). L'impact de ce polymorphisme persiste en analyse multivariée. Ces résultats suggèrent que, chez l'homme, le couple Fractalkine / CX<sub>3</sub>CR1 a un impact dans la migration cellulaire au cours de la GvH cutanée et que le polymorphisme génétique de CX<sub>3</sub>CR1 chez le receveur diminue le risque de GvH cutanée <sup>47</sup>.

## I.B.2. Polymorphismes de gènes codant pour des molécules de l'immunité innée

Le rôle des bactéries pathogènes dans la survenue de GvH a été suggéré dès 1974 par le groupe de Van Bekkum (qui avait observé que les souris placées dans un environnement protégé ne développaient pas de GVH)<sup>48</sup>. La même équipe a montré qu'il existait une interaction entre la flore intestinale et l'activation des LT du donneur<sup>49</sup>, et dès 1984, des études cliniques ont mis en évidence un effet de la décontamination digestive sur la survenue d'une GvH<sup>50</sup>. Lorsqu'ensuite ont été décrits les systèmes de reconnaissance de motifs d'agents pathogènes qui sont des récepteurs spécifiques de l'immunité innée (appelés PRR pour *Pattern-Recognition Receptors* reconnaissant des PAMPS pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), un lien a pu être fait entre les bactéries pathogènes et la modulation de la réponse immunitaire.

Ces PRR peuvent être classés en trois familles<sup>51</sup> :

- les **PRR de signalisation** : TLR (Toll-like receptors), NLR (*NOD(nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors*), RLH (*RIG(Retinoic acid Inducible Gene)-I-Like Helicases*)
- les **PRR endocytiques** : récepteur CD14 GPI-ancré du LPS (lipopolysaccharide), récepteur Scavenger (SR), récepteur au mannane des macrophages (MMR), la famille des CLR (C-type lectin-like receptors)
- les **PRR sécrétés** (opsonines) : collectines telles MBL (*mannan-binding lectin*), ficolines, pentraxines (CRP (*C-reactive protein*), *serum amyloid protein*)...

Les systèmes de reconnaissance de motifs putatifs les mieux caractérisés sont les PRR de signalisation, et notamment les TLR et les NLR : le 1<sup>er</sup> de la douzaine de TLR actuellement connus a été décrit en 1997 comme un analogue humain d'une protéine Toll de la drosophile<sup>52</sup> ; et il a ensuite été nommé TLR4. Les NLR ont été décrits plus tard au début des années 2000 : NOD1 est impliqué dans la reconnaissance de motifs de type LPS, et NOD2 reconnaît un autre motif, le MDP (MuramyDiPeptide).

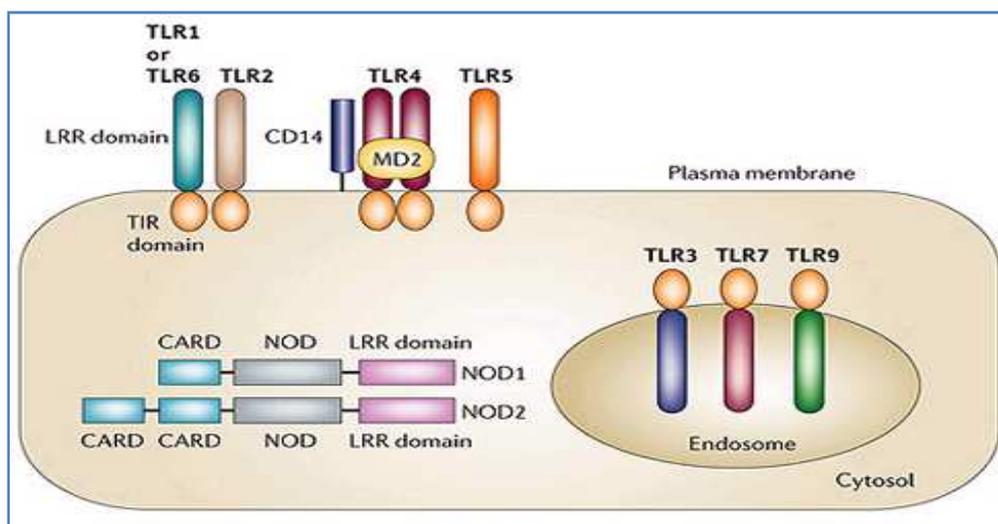


Figure 2 : Localisation cellulaire des principaux *Pattern Recognition Receptors* (d'après<sup>53</sup>).

Alors que les TLR sont des récepteurs membranaires, NOD2 est une protéine cytoplasmique, composée d'un domaine de reconnaissance bactérienne LRR (*Leucine-Rich Repeat*), fait de répétitions riches en Leucine, un domaine NOD d'oligomérisation et de deux domaines CARD (Figure 2). La protéine NOD2 est principalement exprimée par les cellules des épithéliums digestif et pulmonaire.

La reconnaissance par le domaine LRR d'un motif antibactérien MDP permet l'activation de NOD2, ce qui déclenche une cascade de signalisation dans les voies NF $\kappa$ B et des MAP-kinases, en synergie avec le signal déclenché par TLR2. La régulation de la transcription conduit à la production de cytokines et d'autres molécules impliquées dans la défense anti-microbienne (Figure 3).

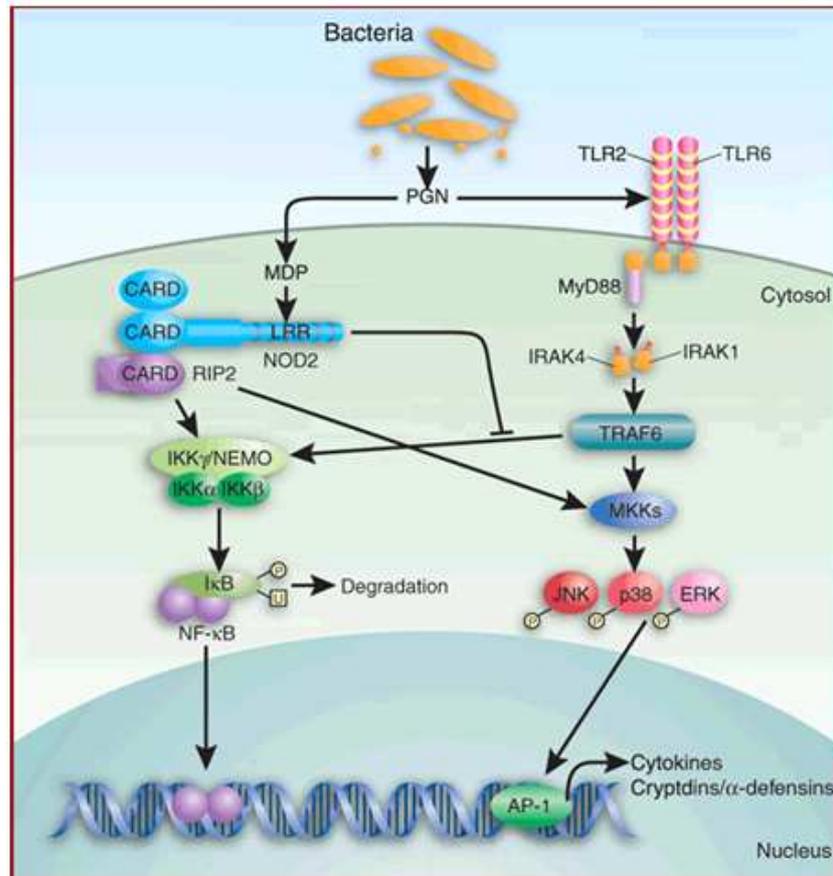


Figure 3 : Signalisation en aval de NOD2 et TLR2 (d'après<sup>54</sup>).

#### - Polymorphismes du gène codant pour NOD2/CARD15

Des mutations du gène, altérant la fonction de NOD2 ont été décrites ; celles situées dans la région LRR sont des polymorphismes de type SNP (Figure 4) et ont été découvertes initialement dans la maladie de Crohn.

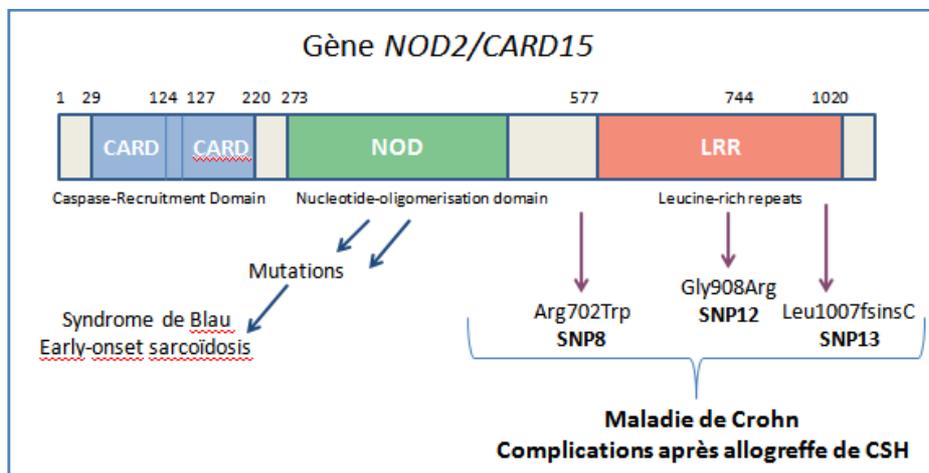


Figure 4 : Mutations et polymorphismes de *NOD2*.

Ces polymorphismes, responsables d'une modification de la réponse inflammatoire et de la défense anti-infectieuse, ont également été impliqués dans certaines complications après allogreffe de CSH.

Plusieurs équipes ont évalué l'impact de ces 3 SNP sur la survenue de GvH aiguë ou chronique, sur la mortalité liée à la procédure (TRM), la survie globale ou l'incidence de rechutes. Les résultats ne sont pas univoques : selon les populations, est mise en évidence une diminution de la GvHa ou de la GvHa digestive, une augmentation des formes sévères de GvHa ou de la bronchiolite oblitérante, une augmentation de la TRM, une diminution de la survie globale voire dans certaines populations de greffés ayant reçu une T-déplétion une augmentation des rechutes (Tableau 1).

Etude	Population	SNP	GVH	TRM / OS
Holler <i>et al.</i> , <sup>55</sup> Blood 2004	169 adultes	R : 21 % D : 14 %	↑ GvH sévère	↑ TRM à 1 an
Holler <i>et al.</i> , <sup>56</sup> Blood 2006	78 adultes 225 adultes + enfants	R : 11 % D : 8 %	↑ GvH sévère ↑ GvHa digestive	↑ TRM ↓ OS
Elmaagacli <i>et al.</i> , <sup>57</sup> Transplantation 2006	403 adultes	D : 11 % R : 14 %	D ↓ GvHa, GvHa dig R ↑ GvHa sévère	Non significatif
Granell <i>et al.</i> , <sup>58</sup> Haematologica 2006	85 adultes	D : 8 % R : 11 %	Pas d'impact	↑ TRM ↓ DFS
Major <i>et al.</i> , <sup>59</sup> JCO 2007	196 adultes T-déplétion (83 %)	D : 17 % R : 13 %	Pas d'impact	Rechute à 2 ans ↓ DFS ↓ OS à 3 ans
Holler <i>et al.</i> , <sup>60</sup> JCO 2008	342 patients LAL et LAM	/	Pas d'impact	↑ TRM (allogreffe familiale)
Holler <i>et al.</i> , Int Care Med 2007	132 adultes sepsis	/	Inadapté	↓ OS
Hildebrandt <i>et al.</i> , <sup>61</sup> BBMT 2008	467 adultes 4 centres européens – Géno & phéno - T-déplétion 30 %	D : 13 % R : 15 %	/	↑ Bronchiolite oblitérante
Sairafi <i>et al.</i> , <sup>62</sup> JCO 2008	198 adultes T-déplétion 61% Myélo-ablatif – Géno 40 %	D : 12 % R : 7,6 %	Non significatif	Non significatif

Tableau 1 : Impact des polymorphismes de *NOD2* sur l'évolution post-allogreffe de CSH - synthèse de la littérature.

### - Polymorphismes des gènes codant pour les TLR

Après la description des TLR, il a été découvert que certains polymorphismes des gènes correspondant étaient associés à une augmentation des infections staphylococciques (pour TLR2)<sup>63</sup> et une augmentation des sepsis (pour TLR4)<sup>64</sup>. Dans le contexte de l'allogreffe de CSH, de nombreuses études se sont intéressées aux polymorphismes des TLR : une étude allemande a mis en évidence une association entre la présence d'un polymorphisme de TLR4 (Thr-399-Ile) chez le donneur et une augmentation significative de l'incidence de GvHa sévère (42 % vs 15 %)<sup>57</sup>. Ces résultats n'ont néanmoins pas été confirmés par une équipe de Seattle qui a analysé ce polymorphisme de TLR4 ainsi qu'un second SNP (Asp-299-Gly) dans une population d'allogreffés en situation apparentée<sup>65</sup>.

Une étude américaine publiée en 2005 a décrit une association entre des polymorphismes de TLR1 et TLR6 et une incidence augmentée d'aspergillose en post-allogreffe<sup>66</sup>. Une autre équipe américaine a rapporté en 2008 une étude de 20 SNP parmi les gènes codant pour TLR2, TLR3, TLR4 et TLR9 chez 336 couples donneurs / receveurs : les deux polymorphismes Asp-299-Gly et Thr-399-Ile de TLR4, ainsi que l'haplotype S4 (correspondant à l'association des 2 SNP), étaient associés à une augmentation d'incidence d'aspergillose pulmonaire invasive, mais uniquement en situation de greffe non apparentée<sup>67</sup>.

### - Polymorphismes du gène codant pour MBL

MBL est une molécule de l'immunité innée impliquée dans la reconnaissance de motifs carbohydrates de différents pathogènes. Il a été décrit plusieurs polymorphismes de type SNP du gène *MBL2* codant pour la protéine MBL. Une étude australienne a analysé l'impact de 5 SNP du gène *MBL2* sur la survenue d'infections sévères après allogreffe de CSH chez 97 couples donneurs/receveurs : il a été montré une augmentation de l'incidence des infections sévères dans les groupes *MBL2* muté chez le donneur, chez le receveur ou à la fois chez le donneur et le receveur<sup>68</sup> ; il s'agissait principalement d'infections bactériennes. L'étude des 5 SNP permettait de définir un haplotype HYA 'haut producteur' de MBL qui était associé à un risque significativement réduit d'infections (5 à 10 fois). L'intérêt peut être thérapeutique puisqu'il existe du MBL purifié (dont les essais sont concluants dans un contexte de patients présentant un déficit immunitaire) qui pourrait être administré pendant le conditionnement ou après la greffe.

### I.B.3. Autres polymorphismes de gènes influençant l'évolution post-greffe

D'autres types de gènes dont des polymorphismes influent l'évolution post-greffe ont été décrits : il s'agit de pharmacogènes qui interviennent dans le métabolisme des drogues, de gènes de l'apoptose...

L'enzyme CYP2B6 est codée par un gène de la famille du cytochrome P450, c'est un pharmacogène qui interfère avec le métabolisme du Cyclophosphamide. En effet, l'ENDOXAN® est une prodrogue, qui doit être hydroxylée par des enzymes hépatiques, dont l'enzyme CYP2B6 pour former les métabolites actifs (puis ses produits de dégradation dont l'acroléine). Les polymorphismes génétiques de CYP2B6 peuvent par conséquent interférer avec le métabolisme de l'ENDOXAN®, comme l'a montré une étude franco-brésilienne dans 107 allogreffes familiales<sup>17</sup>. Le polymorphisme CC ou TT est en effet associé à une augmentation de l'incidence des cystites hémorragiques (60 %, vs 30 %, p=0,025).

Un autre polymorphisme de cette même enzyme CYP2B6 entraîne une diminution de sa synthèse et par conséquent diminue la formation de métabolites toxiques. Ce polymorphisme a été étudié dans cette même population d'allogreffés pour des leucémies aiguës et chroniques après conditionnement myélo-ablatif. Les résultats montrent une diminution de l'incidence des maladies veino-occlusives dans le groupe muté (hétéro ou homozygote) à moins de 5 %, vs 21 % dans le groupe non muté ( $p=0,022$ )<sup>17</sup>.

La molécule Fas, qui appartient aux récepteurs à domaine de mort, joue un rôle dans la mort cellulaire par apoptose qui constitue une importante voie de destruction tissulaire dans la GvH. L'influence d'un polymorphisme du gène de Fas (-670Fas allèle G), qui augmenterait son expression, a été étudiée chez 160 donneurs et receveurs soumis à une procédure d'allogreffe à conditionnement myélo-ablatif. La présence de l'allèle G chez le receveur a été associée à une augmentation de la GvH aiguë et chronique (respectivement 81 vs 58 % et 82 vs 54 %)<sup>12</sup>. On note également dans le groupe 'allèle G' une fréquence plus grande de survenue d'au moins un épisode infectieux majeur (63 vs 36 %,  $p=0,01$ ) avec une diminution de la survie sans infection (45 vs 102 jours).

## II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Nous avons souhaité étudier, dans la population de patients allogreffés au CHU de Nancy depuis 1981, l'impact sur l'évolution post-greffe de polymorphismes de gènes codant pour des cytokines ou des molécules de l'immunité innée.

Parmi les nombreux exemples précédemment décrits, notre choix s'est porté sur l'analyse des polymorphismes SNP8, SNP12, SNP13 du gène NOD2/CARD15 d'une part, et sur celle des polymorphismes de type SNP IL-6<sup>-174</sup>G/C et IL-10<sup>-592</sup>C/A ainsi que des répétitions en tandem VNTR situées dans l'intron 2 du gène IL-1Ra d'autre part.

Grâce à la mise au point des différentes techniques de génotypage de ces quatre polymorphismes réalisée par le Dr F Namour dans le service de Biochimie du Pr JL Guéant, une première cohorte de 133 patients a été étudiée de manière rétrospective, à partir d'un prélèvement sanguin et d'un prélèvement buccal correspondant respectivement aux statuts donneur et receveur.

A partir de 2006, cette étude s'est poursuivie par une analyse prospective de tous les donneurs et tous les receveurs allogreffés dans le service de Transplantation Médullaire du Pr P Bordigoni. De janvier 2006 à avril 2008, 96 couples donneurs / receveurs ont été inclus dans l'étude prospective.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact de l'existence de ces polymorphismes chez le donneur et/ou le receveur sur l'évolution post-greffe, en termes de survenue de GvH aiguë, de GvH aiguë sévère (de grade III-IV), de GvH aiguë digestive, de GvH chronique, de GvH chronique pulmonaire. Nous avons également souhaité évaluer si ces polymorphismes pouvaient influencer sur la survenue de rechutes post-greffe, sur la toxicité liée à la procédure (TRM) et sur la survie globale.

### III. MATERIELS ET METHODES

#### II.A. Couples donneurs / receveurs

Une première cohorte rétrospective est constituée de 133 couples donneur / receveur soumis à une procédure d'allogreffe entre 1981 et 2005. Dans cette cohorte ont été inclus tous les patients allogreffés encore suivis en 2006, c'est-à-dire toujours vivants et non perdus de vue au moment du recrutement. Le statut donneur est étudié à partir d'un prélèvement de sang total sur EDTA (réalisé en post-greffe) pour les patients présentant un chimérisme 100 % donneur. Le statut receveur est déterminé à partir de l'ADN extrait d'un prélèvement endo-buccal ou d'un échantillon sanguin pré-greffe.

La cohorte prospective a inclus tous les patients (et leurs donneurs) allogreffés à partir de 2006 dans le service de Transplantation Médullaire du CHU de Nancy, soit 96 entre janvier 2006 et avril 2008. Les statuts donneur et receveur ont été déterminés à partir de prélèvements de sang total pré-greffe.

Concernant les greffes de sang placentaires, puisque nous ne disposions pas de matériel suffisant, le statut donneur a été étudié grâce à un prélèvement sanguin post-greffe du receveur (réalisé aux alentours de J100 en cas de chimérisme complet). Nous avons exclu le statut donneur dans les quelques situations d'allogreffe de double sang placentaire, ne pouvant déterminer si le cordon typé vers J100 était le seul à participer aux complications post-greffe.

Un consentement éclairé a été signé par chaque patient (ou par les parents lorsque le receveur était un enfant mineur) et chaque donneur vivant de cellules souches hématopoïétiques, après accord du comité local d'éthique lors de l'obtention du PHRC.

#### II.B. Procédures de traitement

Tous les patients allogreffés ont été retenus dans cette étude, sans sélection selon le type d'allogreffe. Les procédures de traitement sont discutées pour chaque patient en comité de greffe, en fonction de l'indication de la greffe, de la pathologie sous-jacente, des donneurs disponibles et de la situation clinique actuelle du patient.

- **Processus de sélection du donneur** : l'allogreffe est réalisée en situation géno-identique (apparentée) lorsqu'un donneur HLA-compatible est trouvé dans la fratrie. En l'absence de donneur familial compatible, une recherche de donneur volontaire non apparenté est réalisée sur le fichier international de greffes. La disponibilité d'un donneur HLA-compatible 9/10 ou 10/10 permet son recrutement ; dans le cas inverse, est envisagée une greffe de simple ou double sang placentaire en fonction de la richesse du greffon et du poids du patient.

- **Choix du type de conditionnement** : un conditionnement myélo-ablatif est préféré pour les patients les plus jeunes (< 45 à 50 ans) en l'absence de comorbidités, d'antécédents de chimiothérapie lourde ou d'infection évolutive. Les conditionnements myélo-ablatifs associent le plus souvent ICT -irradiation corporelle totale 12 Gy- et Cyclophosphamide, ou Busulfan et Cyclophosphamide. Pour les patients non éligibles pour une allogreffe à conditionnement standard, est préféré un conditionnement à intensité réduite ('mini-allogreffe'), plus ou moins ablatif ou immunosuppresseur selon l'indication de la greffe, de type Fludarabine/Melphalan, Busulfan/Fludarabine ou ICT 2 Gy/Fludarabine principalement.

- **Choix du type d'immunosuppression** : le choix du type de prophylaxie de la GvH est fonction du conditionnement, de l'indication et du statut de la maladie à la greffe. Sont utilisées principalement les associations Ciclosporine/Méthotrexate pour les greffes myélo-ablatives et Ciclosporine/MMF pour les greffes à intensité réduite. Une déplétion lymphocytaire par sérum anti-lymphocytaire SAL ou plus rarement Mabcampath est généralement associée au conditionnement.

- **Prophylaxie anti-infectieuse** : une décontamination digestive non sélective et non absorbable (associant aminoside et glycopeptide) était administrée à tous les receveurs avant le début du conditionnement, associée à l'utilisation de Métronidazole dans le but de diminuer l'incidence de la GvH aiguë digestive. Une prophylaxie antifongique par Triflucan puis Sporanox est réalisée dès le début du conditionnement, élargie par Voriconazole ou plus récemment par Posaconazole en cas de nécessité d'une corticothérapie pour GvH.

- **Traitement de la GvH** : la survenue d'une GvH aiguë de grade II à IV prouvée histologiquement conduit au début d'une corticothérapie intraveineuse à 2,5 mg/kg/jour pendant 14 jours suivie d'une décroissance progressive ; en cas de cortico-résistance, le traitement de 2<sup>ème</sup> ligne est une immunothérapie anti-IL-2. Le traitement des GvH de grade I (digestive haute isolée par exemple) repose sur une corticothérapie à 1 mg/kg/j +/- associée à un traitement local par ENTOCORT®. La GvH chronique était documentée histologiquement pour les atteintes cutanées ou digestives. Une atteinte pulmonaire liée à la GvH était suspectée par la clinique, et confirmée par la réalisation d'explorations fonctionnelles respiratoires et d'un scanner à haute définition (mais rarement prouvée par biopsie pulmonaire). La prise en charge d'une GvH chronique extensive associe en première ligne l'association de Ciclosporine et d'une corticothérapie à 1 mg/kg. Les traitements de la GvHc cortico-résistante peuvent comporter des photophérèses et des associations d'immunosuppresseurs (MMF, sirolimus...) selon des procédures codifiées dans le service.

- **Traitement des infections** : en cas de survenue d'une infection bactérienne ou d'une aplasie fébrile est débutée une antibiothérapie de type Ceftazidime/Teicoplanine ; la surveillance des PCR virales conduit au traitement pré-emptif de réactivations par Ganciclovir ou Valganciclovir pour le CMV, Foscavir pour l'HHV6, Cidofovir pour l'Adénovirus. Les infections fongiques font l'objet de prises en charge spécifiques selon les recommandations internationales.

## II.C. Génotypage des polymorphismes

L'ensemble des génotypes a été réalisé dans le service de Biochimie du Pr JL Guéant par le Dr F Namour et son équipe.

La détection des polymorphismes SNP 8 (Arg702Trp), 12 (Gly908Arg) et 13 (Leu1007fsinsC) de NOD2/CARD15, ainsi que IL-6<sup>-174</sup>G/C et IL-10<sup>-592</sup>C/A, repose sur une technique de PCR en temps réel utilisant des sondes d'hybridation de type FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfert*) ; ce système permet de réaliser des courbes de fusion, la distinction des allèles étant fonction de la température de fusion. La détection du polymorphisme de type VNTR du gène de l'IL-1Ra (au niveau de l'intron 2) est réalisée par PCR conventionnelle avec détection par électrophorèse en gel d'agarose.

Pour tous les échantillons, l'ADN génomique est extrait grâce à un kit K1AGEN à partir de sang total ou à partir d'un prélèvement buccal pour les patients inclus dans l'étude rétrospective, afin d'obtenir le statut pré-greffe. La concentration de l'ADN est mesurée par spectrophotométrie.

### - Génotypage des SNP 8, 12 et 13 du gène NOD2/CARD15

Les réactions sont réalisées dans une plaque 96 puits pour un volume final de 10 µL. Pour chaque échantillon sont mélangés 2 µL du MIX LC 480 5X, 0,5 µM de chaque amorce sens et anti-sens, 0,2 µM de chaque sonde marquée et 2 µL d'ADN génomique. Les amorces sens et anti-sens sont respectivement 5'AGC CGC ACA ACC TTC AGA TCA C 3' et 5' GGT GCA GCT GGC GGG AT 3' pour le SNP8 (Arg702Trp), 5' GGG AGG AGG ACT GTT AGT TCA T 3' et 5'CTG ATC TCC CCA AGA AAA CTG 3' pour le SNP12 (Gly908Arg), 5'TCT TCT TTT CCA GGT TGT CCA A 3' et 5'AAA AAC TGA GGT TCG GAG AGC TAA 3' pour le SNP13 (Leu1007fsinsC). Les conditions de PCR sur Lightcycler® (Rochediagnostic™) sont les suivantes : après une première dénaturation à 95° pendant 10 min, la réaction d'amplification comprend 45 cycles avec une dénaturation à 95° pendant 10 sec, une hybridation à 60° pendant 10 sec et une élongation à 72° pendant 10 sec. Les courbes de fusion sont réalisées après 30 min à 95° et 60 min à 40°. Le résultat du génotypage est déduit de la température de fusion de chaque échantillon selon le tableau 2.

SNP	Allèle	Génotypage	Température de fusion (Tm)
SNP 8	Homozygote sauvage	CC	66°
	Hétérozygote	CT	66° & 52°
	Homozygote muté	TT	52°
SNP12	Homozygote sauvage	GG	61°
	Hétérozygote	GC	61° & 53°
	Homozygote muté	CC	53°
SNP13	Homozygote sauvage	wt/wt	56°
	Hétérozygote	wt/insC	56° & 62°
	Homozygote muté	Ins C / ins C	62°

Tableau 2 : Détermination allélique des SNP de NOD2 selon la température de fusion.

### - Génotypage des polymorphismes IL-6<sup>-174</sup> G/C et IL-10<sup>-592</sup> C/A

Selon le même principe, sont mélangés pour chaque échantillon 2 µL du MIX LC 480 5X, 0,5 µM de chaque amorce sens et anti-sens, 0,2 µM de chaque sonde marquée pour IL-6<sup>-174</sup>G/C ou 0,15 µM pour IL-10<sup>-592</sup>C/A, 2 µM de MgCl<sub>2</sub> pour IL-6<sup>-174</sup>G/C, et 2 µL d'ADN génomique. Les amorces sens et anti-sens sont respectivement 5' TTA CTC TTT GTC AAG ACA TGC CA 3' et 5' ATG AGC CTC AGA CAT CTC CAG 3' pour IL-6<sup>-174</sup>G/C, 5' TCA TTC TAT GTG CTG GAG ATG G 3' et 5' CCT AGG TCA CAG TGA CGT GG 3' pour IL-10<sup>-592</sup>C/A.

Les conditions de PCR sont : 95° pendant 10 min, puis amplification par 40 cycles pour IL-6<sup>-174</sup>G/C et 50 cycles pour IL-10<sup>-592</sup>C/A avec une dénaturation à 95° pendant 5 sec, une hybridation à 60° pendant 5 sec pour IL-6<sup>-174</sup>G/C, 59° pendant 10 sec pour IL-10<sup>-592</sup>C/A pendant 10 sec et une élongation à 72° pendant 15 sec pour IL-6<sup>-174</sup>G/C, 25 sec pour IL-10<sup>-592</sup>C/A. Les courbes de fusion sont réalisées après 30 minutes à 95° et 1 heure à 40° pour IL-6<sup>-174</sup>G/C ou 2 h à 40° pour IL-10<sup>-592</sup>C/A. Les températures de fusion pour chaque génotype sont précisées dans le tableau 3.

SNP	Allèle	Génotypage	Température de fusion (T <sub>m</sub> )
IL-6 <sup>-174</sup> G/C	Homozygote sauvage	GG	63°
	Hétérozygote	GC	63° & 55°
	Homozygote muté	CC	55°
IL-10 <sup>-592</sup> C/A	Homozygote sauvage	CC	62°
	Hétérozygote	CA	62° & 50°
	Homozygote muté	AA	50°

Tableau 3 : Détermination allélique des SNP IL-6<sup>-174</sup>G/C et IL-10<sup>-592</sup>C/A selon la température de fusion.

### - Génotypage des polymorphismes VNTR de l'intron 2 du gène IL-1Ra

La détection du nombre de répétitions à l'intérieur de l'intron 2 du gène IL-1Ra a utilisé une réaction d'amplification classique avec révélation par électrophorèse, selon une technique décrite en 1993<sup>69</sup>.

Sont mélangés pour chaque échantillon 5 µL de tampon de PCR 10X, 0,5 pM/µL de chaque amorce sens et anti-sens, 0,06 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA 5 U/µL, et 2 µL d'ADN génomique. Les amorces sens et anti-sens sont respectivement 5' CTC AGC AAC ACT CCT AT 3' et 5' TCC TGG TCT GCA GGT AA 3'.

Une dénaturation initiale est réalisée à 96° pendant 1 min, suivie d'une réaction d'amplification classique de 30 cycles composés d'une dénaturation à 96° pendant 1 min, une hybridation à 60° pendant 1 min et une élongation à 70° pendant 2 min. Après le dernier cycle, une dernière élongation est réalisée à 72° pendant 7 min et la révélation se fait par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. L'allèle est déterminé en fonction du nombre de répétitions qui découle lui-même de la taille (en paires de bases) du produit de PCR correspondant à la bande détectée (Tableau 4).

Allèle	Nombre de répétitions	Taille (en paires de bases)
A1	4	410
A2	2	240
A3	5	500
A4	3	325
A5	6	595

**Tableau 4 : Détermination des allèles d'IL-1Ra selon le nombre de répétitions VNTR.**

Le résultat du génotypage des polymorphismes du gène de l'IL-1Ra est exprimé en termes d'allèles.

## II.D. Analyse statistique

Les données cliniques ont été recueillies par l'étude des dossiers de chaque patient, et par recoupement avec les données saisies informatiquement par le Pr P Bordigoni dans un fichier Excel.

L'analyse statistique a été réalisée par Bernard Herbeth (INSERM-CHU Nancy) à l'aide du logiciel SAS. Les critères principaux d'étude (variables dépendantes) sont les taux de survenue de GvH aiguë, GvHa digestive, GvH chronique et GvH pulmonaire, ainsi que les taux de rechute, de toxicité liée à la procédure et la survie globale.

Les associations entre les taux de survenue de GvH et les différents groupes mutés ou non ont été recherchées par un test du Khi 2 ou un test de Fisher lorsque l'échantillon était réduit (analyse univariée).

Ensuite le modèle de régression logistique multivarié a été utilisé pour analyser les relations entre les caractéristiques pré-greffe et la probabilité de survenue de GvH. Les résultats sont exprimés sous forme de risque (ou de probabilité ou Odds Ratio OR).

### III. RESULTATS

#### III.A. Caractéristiques de la population étudiée

Les caractéristiques des allogreffes sont résumées dans le tableau 5.

Caractéristiques		Nombre (%)
<b>Adultes / Enfants</b>		118 (51,5 %) / 111 (48,5 %)
<b>Age médian</b>		23 ans [0,3 – 64,5]
<b>Diagnostic</b>	LAM / MDS	77 (33 %) / 16 (7 %)
	LAL	44 (20 %)
	LMC / autres SMP	15 (7 %) / 5 (2 %)
	Hodgkin / LNH	9 (4 %) / 10 (4,5 %)
	LLC	4 (2 %)
	Aplasies médullaires	16 (7 %)
	Hémoglobinopathies	9 (4 %)
	Déficits immunitaires	10 (4 %)
	Maladies métaboliques	9 (4 %)
	Tumeurs solides	4 (2 %)
<b>Risque*</b>	Haut risque	102 (45 %)
	Bas risque	127 (55 %)
<b>Type de greffe</b>	Familiale	130 (57 %)
	Non apparentée	99 (43 %)
<b>Conditionnement</b>	Myélo-ablatif	130 (57 %)
	Intensité réduite (RIC)	99 (43 %)
<b>Greffon</b>	Moelle	132 (57 %)
	CSP	78 (32 %)
	Cordon(s)	14 + 9 (11 %)
<b>Prophylaxie de la GvH</b>	CSA / MTX	108 (47 %)
	CSA / MMF	86 (38 %)
<b>Déplétion lymphocytaire</b>	SAL Frésenius ou Thymo	140 (61 %)
	<i>Ex vivo</i> ou Campath	6 (3 %)
	Aucune	82 (36 %)
<b>Décontamination digestive avec Métronidazole</b>		200 (87 %)
<b>Taux de CD34 médian</b>		$3,58 \cdot 10^6$ / Kg [0 – 9,9]

Tableau 5 : Caractéristiques des couples donneurs / receveurs.

\* Risque défini selon le statut de la maladie (au-delà de la 1<sup>ère</sup> RC, de la phase chronique pour les LMC...) <sup>70</sup>.

Cette étude comporte 118 adultes et 111 enfants, d'âge médian de 23 ans. Les diagnostics ayant conduit à l'allogreffe sont variés (principalement des leucémies aiguës, et une proportion relativement importante de pathologies non malignes telles des aplasies médullaires, des déficits immunitaires, des maladies métaboliques). Quarante-cinq pour cent des greffes étaient de haut risque. La greffe était réalisée dans 57 % des cas en situation géno-identique, et dans 57 % des cas après conditionnement myéloablatif. La source du greffon était principalement médullaire (57 %), de part la forte proportion d'enfants, avec 1/3 de greffes à base de CSP et 11 % de cordons répartis en 14 simples et 9 doubles cordons. Seulement 3 % des greffes comportaient une T-déplétion *ex vivo*, mais 61 % des patients ont reçu du SAL. A noter que près de 90 % des receveurs avaient reçu une décontamination digestive associée à du Métronidazole.

La fréquence de la GvHa est de 67 %, celles de la GvHa de grade II à IV et de la GvHa digestive de 56 % et 41,5 %. 42 % des receveurs encore en vie à J100 ont présenté une GvHc, et 6 % une forme pulmonaire.

### III.B. Fréquence des polymorphismes

#### III.B.1. Fréquence des SNP de *NOD2/CARD15*

La fréquence des polymorphismes de *NOD2* est similaire aux données publiées dans la littérature, d'environ 15 à 20 % (Tableau 6). Dans notre population, le SNP8 est le plus fréquent (9,6 % chez le donneur et 11,7 % chez le receveur). Parmi les 178 couples donneur / receveur pour lesquelles nous disposons de données à la fois pour le donneur et le receveur, il existe une mutation chez le donneur et chez le receveur dans 10 cas pour le SNP8 (5,6 %), 2 cas pour le SNP12 (1,1 %) et 5 cas pour le SNP13 (2,8 %).

	DONNEUR N = 209			RECEVEUR N = 197		
	SNP 8	SNP 12	SNP 13	SNP 8	SNP 12	SNP 13
Absence de mutation (WT)	189 90,4 %	203 97,1 %	198 94,7 %	173 87,8 %	193 98 %	183 92,9 %
<b>Mutation hétérozygote</b>	<b>20</b> <b>9,6 %</b>	<b>6</b> <b>2,9 %</b>	<b>11</b> <b>5,3 %</b>	<b>23</b> <b>11,7 %</b>	<b>4</b> <b>2 %</b>	<b>14</b> <b>7,1 %</b>
Mutation homozygote	0 0 %	0 0 %	0 0 %	<b>1</b> <b>0,5 %</b>	0 0 %	0 0 %

Tableau 6 : Fréquence des polymorphismes de *NOD2* chez le donneur et le receveur.

### III.B.2. Fréquence des polymorphismes des gènes des cytokines

Les polymorphismes IL-6<sup>-174</sup>G/C, IL-10<sup>-592</sup>C/A et VNTR IL-1Ra (présence de l'allèle 2) sont relativement fréquents dans notre population : entre 31 et 56 % (Tableau 7), avec une fréquence d'homozygotes de 3 à 12 %.

Le polymorphisme IL-6<sup>-174</sup>G/C est le plus rencontré, dans 56 % des cas chez les donneurs et 50 % chez les receveurs. Le SNP IL-10<sup>-592</sup>C/A est retrouvé chez près de la moitié des receveurs et 40 % des donneurs, et l'allèle 2 du polymorphisme VNTR d'IL-1Ra est présent chez 31 % des receveurs et 39 % des donneurs.

	DONNEUR			RECEVEUR		
	IL-6 <sup>-174</sup> G/C n = 209	IL-10 <sup>-592</sup> C/A n = 207	IL-1Ra allèle 2 n = 207	IL-6 <sup>-174</sup> G/C n = 194	IL-10 <sup>-592</sup> C/A n = 195	IL-1Ra allèle 2 n = 159
Absence de mutation (WT)	92 44 %	125 60 %	126 61 %	96 50 %	100 51 %	109 68,5 %
<b>Mutation hétérozygote</b>	<b>92 44 %</b>	<b>67 32,5 %</b>	<b>69 33 %</b>	<b>78 40 %</b>	<b>82 42 %</b>	<b>44 28 %</b>
<b>Mutation homozygote</b>	<b>25 12 %</b>	<b>15 7,5 %</b>	<b>12 6 %</b>	<b>20 10 %</b>	<b>13 7 %</b>	<b>6 3,5 %</b>
<b>Total</b>	<b>117 56 %</b>	<b>82 40 %</b>	<b>81 39 %</b>	<b>98 50 %</b>	<b>95 49 %</b>	<b>50 31,5 %</b>

Tableau 7 : Fréquence des polymorphismes IL-6<sup>-174</sup>G/C, IL-10<sup>-592</sup>C/A et VNTR (allèle 2) IL-1Ra.

### III.C. Impact des polymorphismes sur l'incidence de la GvH aiguë

#### III.C.1. Impact des SNP de *NOD2/CARD15*

Nous avons étudié l'impact de chaque SNP donneur et chaque SNP receveur sur l'incidence de la GvHa. Dans le groupe 'SNP8 Donneur muté', on note une diminution de la **GvH aiguë** à 45 %, vs 68 % dans le groupe *wild type* ( $p=0,037$ ), ainsi qu'une diminution significative de la **GvHa digestive** à 20 %, vs 43 % dans le groupe non muté ( $p=0,027$ ).

Nous n'avons pas retrouvé de différence en termes de GvHa sévère (grade III-IV). Dans le groupe 'SNP8 Receveur muté', les diminutions de GvHa et GvHa digestive ne sont pas statistiquement significatives (Tableau 8).

Incidence de GvH	SNP 8 DONNEUR			SNP 8 RECEVEUR		
	WT n= 189	Mutation n = 20	P	WT n = 173	Mutation n = 24	P
<b>GvHa</b>	<b>68 %</b>	<b>45 %</b>	<b>0,037</b>	70 %	54 %	NS
<b>GvHa digestive</b>	<b>43 %</b>	<b>20 %</b>	<b>0,027</b>	46 %	29 %	NS
<b>GvHa sévère (grade III-IV)</b>	4,8 %	5 %	NS	6,3 %	0 %	NS

Tableau 8 : Impact du SNP8 de *NOD2* sur l'incidence de la GvH aiguë.

Par ailleurs, les taux de GvHa, GvHa digestive et GvHa de grade III-IV ne sont pas différents entre les couples mutés ou non pour les SNP12 et 13.

#### III.C.2. Impact des polymorphismes des gènes des cytokines

##### IL-6<sup>-174</sup>G/C

Alors qu'il n'a pas été mis en évidence de différence de taux de survenue de GvH aiguë et de GvHa digestive entre les groupes 'polymorphique' et 'sauvage' pour le gène de l'IL-6, il existe une augmentation significative du taux de **GvH aiguë de grade III-IV**, à 11,7 % pour le groupe muté (allèles GC ou CC), vs 1,7 % pour le groupe non muté ( $p=0,027$ ).

##### IL-10<sup>-592</sup>C/A

On observe une diminution du taux de **GvH aiguë** dans le groupe 'donneur muté pour l'IL-10' (allèles AC ou AA), à 57,3 %, vs 71,2 % pour le groupe non muté ( $p=0,039$ ). Il n'est pas observé de différence significative entre les groupes mutés ou non chez le receveur.

### IL-1Ra VNTR (allèle A2)

Il existe une augmentation non significative du taux de survenue de **GvH aiguë**, à 83 % dans le groupe 'donneur homozygote pour l'allèle A2/A2', vs 65 % pour les autres allèles (NS).

## III.D. Impact des polymorphismes sur l'incidence de la GvH chronique

### III.D.1. Impact des SNP de *NOD2/CARD15*

Nous avons également étudié l'impact de chaque SNP de *NOD2* sur l'incidence de la GvHc.

La fréquence de la GvHc et de la GvHc digestive n'est pas différente entre les groupes SNP8 mutés et non mutés. En revanche, il existe une augmentation de la **GvH chronique pulmonaire** dans le groupe 'Donneur muté pour le SNP8', à 21 %, vs 5,9 % dans le groupe non muté ( $p=0,028$ ). Dans le groupe 'SNP8 muté Receveur', l'incidence de la GvHc pulmonaire est augmentée à 15,7 % mais ce n'est pas statistiquement significatif (Tableau 9).

Incidence de GvH	SNP 8 DONNEUR			SNP 8 RECEVEUR		
	WT n = 186	Mutation n = 15	P	WT n = 169	Mutation n = 20	P
<b>GvHc</b>	45 %	33 %	NS	44 %	50 %	NS
<b>GvHc digestive</b>	20 %	21 %	NS	25 %	26 %	NS
<b>GvHc pulmonaire</b>	<b>5,9 %</b>	<b>21 %</b>	<b>0,028</b>	<b>5,3 %</b>	<b>15,7 %</b>	<b>0,077</b>

Tableau 9 : Impact du SNP8 de *NOD2* sur l'incidence de la GvH chronique.

A noter que les incidences de GvH chronique, digestive ou pulmonaire, ne sont pas différentes entre les groupes mutés ou non pour les SNP12 et 13.

### III.D.2. Impact des polymorphismes des gènes des cytokines

#### IL-6<sup>-174</sup>G/C

Dans le groupe 'receveur muté pour IL-6<sup>-174</sup>G/C', il existe une augmentation significative du taux de **GvH chronique**, à 53 % pour les allèles GC ou CC, vs 38 % pour l'allèle sauvage GG ( $p=0,02$ ). Dans ce même groupe, nous constatons une augmentation significative de la **GvHc pulmonaire**, avec un taux de survenue de 6,7 % pour les hétérozygotes (allèle GC), 21 % pour les homozygotes (allèle CC), vs 3,3 % pour le groupe 'allèle sauvage GG' ( $p=0,02$ ).

Il n'est pas retrouvé de différence en cas de polymorphisme présent chez le donneur uniquement.

### IL-10<sup>-592</sup> C/A

Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre ce polymorphisme du gène codant pour l'IL-10 et la survenue de GvH chronique.

### IL-1Ra VNTR (allèle A2)

Il existe une augmentation du taux de **GvH chronique** si le donneur présente l'allèle A2 du polymorphisme VNTR de façon homozygote, avec un taux de GvHc à 83 % (allèle A2/A2), vs 41 % pour les autres génotypes (p=0,014).

## III.E. Impact des polymorphismes sur les autres complications post-greffe

La protéine NOD2 intervenant dans la surveillance anti-microbienne, nous avons souhaité évaluer si les polymorphismes de *NOD2/CARD15* étaient associés à une augmentation de l'incidence des sepsis survenant après allogreffe de CSH. Il n'a pas été mis en évidence de différence entre les groupes mutés ou non, que ce soit chez le receveur ou le donneur, en termes d'incidence de sepsis avant J100 (défini par une bactériémie ou un sepsis sévère nécessitant un remplissage vasculaire ou un transfert en réanimation).

Nous n'avons pas mis non plus en évidence de lien entre la présence d'un polymorphisme de *NOD2/CARD15* et une augmentation du taux de rechute, de la toxicité liée à la greffe (TRM) ou une diminution de la survie.

En revanche, la **mortalité liée à la procédure** (non liée à une rechute) est augmentée à 50 % dans le groupe 'donneur homozygote pour l'allèle A2 d'IL-1Ra (allèle A2/A2)' (n = 12), vs 10 % pour les autres allèles (p=0,049).

### III.F. Intérêt de l'impact du SNP 8 de *NOD2* sur l'évolution post-greffe

#### III.F.1. Analyse multivariée

En analyse multivariée, deux variables sont associées de façon indépendante à une incidence moindre de **GvH aiguë digestive** : le statut SNP8 donneur muté et un taux élevé de CD34. Le statut haut risque de la greffe est également un facteur indépendant, associé à une plus importante incidence de GvHa digestive (Tableau 10).

Concernant la **GvH chronique pulmonaire**, le SNP8 donneur muté est le seul facteur associé de façon indépendante à un sur-risque de GvHc pulmonaire.

	Variable	Odds ratio [IC]	P
<b>GvH aiguë digestive</b>	<b>SNP 8 D muté</b>	<b>0,28 [0,09 – 0,91]</b>	<b>0,03</b>
	CD34 > 4.10 <sup>6</sup>	0,446 [0,24 – 0,83]	0,01
	Greffe de haut risque	2,284 [1,24 – 4,22]	0,008
<b>GvH chronique pulmonaire</b>	<b>SNP 8 D muté</b>	<b>5,682 [1,18 – 27,40]</b>	<b>0,03</b>
	Greffe de CSP	3,237 [0,31 – 34]	0,05

Tableau 10 : Impact pronostique de la présence chez le donneur du SNP8 de *NOD2* en analyse multivariée.

#### III.F.2. Sous-analyse de la population pédiatrique

Nous avons réalisé une analyse de sous-groupe de notre population pédiatrique, qui comporte 111 enfants, dont 33 ont été étudiés de manière prospective.

L'âge médian est de 6 ans, et les diagnostics sont constitués par plus d'un tiers de pathologies bénignes (la répartition précise est la suivante : 30 LAL, 22 LAM, 11 aplasies médullaires, 8 leucémies myélo-monocytaires chroniques juvéniles, 9 déficits immunitaires, 9 maladies métaboliques, 8 hémoglobinopathies, 6 LMC et 2 autres syndromes myéloprolifératifs, 3 tumeurs solides, 2 maladies de Hodgkin et 2 lymphomes non hodgkiniens). La majorité des greffes était réalisée avec un greffon médullaire (70 %), après conditionnement myélo-ablatif (79 %).

La fréquence des SNP n'était pas différente de notre population globale (Tableau 11).

	DONNEUR N = 107			RECEVEUR N = 93		
	SNP8	SNP12	SNP13	SNP8	SNP12	SNP13
Absence de mutation (WT)	100 93,5 %	103 96,3 %	104 97,2 %	82 88,2 %	89 95,7 %	88 94,6 %
<b>Mutation hétérozygote</b>	<b>7</b> <b>6,5 %</b>	<b>4</b> <b>3,7 %</b>	<b>3</b> <b>2,8 %</b>	<b>11</b> <b>11,8 %</b>	<b>4</b> <b>4,3 %</b>	<b>5</b> <b>5,4 %</b>

Tableau 11 : Fréquence des SNP de *NOD2* dans la population pédiatrique.

L'étude de la **GvH aiguë** a montré une incidence significativement diminuée dans le groupe SNP8 donneur, à 29 %, vs 71 % pour les donneurs non mutés. La diminution de la fréquence de la GvHa digestive n'est pas significative (Tableau 12).

L'analyse multivariée ne retrouve que le statut haut risque de la greffe comme facteur indépendant (OR à 3,5 [1,09 – 3,55], p=0,006).

Incidence de GvH	SNP 8 DONNEUR			SNP 8 RECEVEUR		
	WT n = 100	Mutation n = 7	P	WT n = 82	Mutation n = 11	P
<b>GvHa</b>	<b>71 %</b>	<b>29 %</b>	<b>0,028</b>	73 %	45 %	0.051
<b>GvHa digestive</b>	45 %	14,3 %	0,09	48 %	36 %	NS
<b>GvHc</b>	35 %	28 %	NS	36 %	36 %	NS
<b>GvHc pulmonaire</b>	<b>2 %</b>	<b>17 %</b>	<b>0,03</b>	3 %	0 %	NS

Tableau 12 : Impact d'un SNP 8 chez le donneur dans la population pédiatrique.

Concernant la GvH chronique, il existe également dans ce sous-groupe pédiatrique une augmentation de l'incidence de la **GvH chronique pulmonaire**, à 17 % dans le groupe 'SNP8 donneur' par rapport à 2 % pour le groupe non muté (p=0,03). Il n'y avait aucun cas de GvHc pulmonaire dans le sous-groupe 'SNP8 receveur' (Tableau 12).

## IV. DISCUSSION – PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mettre en évidence une importance de la présence d'un polymorphisme de type SNP 8 de *NOD2/CARD15* chez le donneur : il existe en effet, dans notre cohorte d'allogreffés, un impact de ce polymorphisme sur les complications post-allogreffe, en termes de diminution de la GvH aiguë et de la GvHa digestive et en termes d'augmentation de la GvH chronique pulmonaire, notamment dans la population pédiatrique.

Ces résultats rejoignent ceux publiés par une équipe allemande en 2006<sup>57</sup>. La 'localisation' de la mutation (sur les cellules du receveur ou du donneur) semble avoir une importance toute particulière, puisque plusieurs études ont montré que l'existence de mutations de type SNP chez le receveur était associée à une augmentation de la survenue de GvHa sévères et une augmentation de la toxicité liée à la procédure (TRM)<sup>55</sup>. Les hypothèses pour expliquer ces résultats (paraissant discordants) se basent sur la physiopathologie de la GvH et certaines constatations sur des modèles expérimentaux.

- L'existence d'une mutation chez le receveur fait suspecter une diminution de la réaction immune déclenchée par la présence de bactéries au contact des cellules épithéliales digestives et par voie de conséquence une altération des défenses anti-microbiennes avec augmentation potentielle des translocations bactériennes (comme cela a été montré dans des modèles expérimentaux<sup>71</sup>) pouvant expliquer une morbidité et une mortalité accrues.

- En présence d'un polymorphisme chez le donneur, on peut envisager qu'il existe une altération de la réponse immune dérivée des cellules du donneur, soit une diminution des réponses Th1 médiées par la voie NFkB ; or la polarisation Th1 est la base de l'activation des LT qui constitue, selon le modèle de Ferrara<sup>1</sup>, la 2<sup>ème</sup> phase du processus qu'est la GvH : cette altération des réponses Th 1 peut par conséquent participer à la diminution de la réaction allogénique du greffon contre l'hôte.

Une autre hypothèse émise par l'équipe d'E Holler est celle d'une signification pronostique différente des polymorphismes de *NOD2* en fonction du type de décontamination intestinale utilisée<sup>56</sup>. L'intérêt de l'utilisation d'une décontamination anti-anaérobie par Métronidazole avait déjà été démontré en 1999 dans le but de diminuer l'incidence de la GvH aiguë<sup>72</sup>. Par ailleurs, il a été montré que l'impact sur la GvH des SNP de *NOD2* était différent selon si la décontamination utilisée était sélective ou dirigée à la fois contre les bactéries Gram négatif et Gram positif<sup>56</sup>. Dans notre population, la faible incidence de GvH aiguë en présence de SNP de *NOD2* peut vraisemblablement aussi être expliquée par l'utilisation d'une part de Métronidazole par voie intraveineuse (débuté avant le conditionnement) et d'autre part d'une décontamination digestive totale non sélective visant à la fois les Gram positif et Gram négatif.

A noter que dans l'étude allemande dont nos résultats sont les plus proches<sup>57</sup>, l'incidence globale de la GvHa est similaire (65 %) mais l'incidence de GvH digestive est plus faible (24 %, contre 40 % dans notre cohorte).

Concernant la GvHc pulmonaire, nos résultats se rapprochent de ceux d'une étude européenne multicentrique<sup>61</sup> qui décrit une incidence globale de bronchiolite oblitérante de 3 %, augmentée à 22 % lorsqu'il existe une mutation variant de *NOD2* chez le receveur. Dans notre population, la fréquence d'atteinte pulmonaire au cours de la GvHc est de 6 % et augmentée à 21 % en présence d'un polymorphisme SNP 8 de *NOD2* chez le receveur.

Les analyses concernant les autres polymorphismes (SNP12 et 13) ne sont pas significatives, mais probablement les effectifs étaient insuffisants pour les SNP12 et 13, moins fréquents dans notre étude.

Cette étude a également permis de mettre en évidence un impact négatif de la présence chez le receveur d'un polymorphisme IL-6<sup>-174</sup>G/C (allèle GC ou CC), avec augmentation de la survenue de GvH aiguë de grade III-IV, et augmentation des taux de GvH chronique et de GvHc pulmonaire, comme cela avait déjà été montré par plusieurs équipes<sup>31-33</sup>. Enfin, cette étude confirme des résultats précédemment publiés sur l'association entre un polymorphisme du gène de l'IL-10<sup>-592</sup>C/A chez le donneur et une diminution de la GvH aiguë<sup>6</sup>.

Nous poursuivons les inclusions dans l'étude prospective afin d'éliminer le biais de sélection lié aux patients analysés de façon rétrospective.

Si ces résultats se confirment, le statut pré-greffe de *NOD2* (et notamment du SNP8) pourrait être pris en compte dans le processus de sélection des donneurs, en association aux autres critères, et d'autant plus si le receveur est porteur d'un polymorphisme SNP IL-6<sup>-174</sup>G/C. En l'absence de multiples donneurs disponibles, cela pourrait conduire, cas de choix d'un donneur 'muté', à une attitude 'pré-emptive' de surveillance accrue de la fonction respiratoire qui pourrait être réalisée à domicile afin de détecter précocement une atteinte pulmonaire, comme nous le faisons actuellement pour certains patients atteints de GvH chronique extensive. La cohorte pédiatrique mise à jour (avec inclusions jusqu'en 2009) est d'ailleurs en cours d'analyse afin de valider ces premiers résultats.

Enfin, cette étude sur l'impact des polymorphismes de *NOD2/CARD15*, qui avait fait l'objet d'une communication orale au congrès 2008 de la SFGM-TC, a particulièrement intéressé l'équipe du Pr Jean-Paul Vernant de l'hôpital de la Pitié Salpêtrière. Le Dr Nathalie Dhédin, qui avait travaillé sur l'impact d'un polymorphisme d'un récepteur à une chimiokine *CX3CR1* sur la survenue de GvH cutanée, a proposé de poursuivre ce travail en collaboration : ainsi, nous avons prévu d'analyser l'impact de ces polymorphismes de *NOD2* dans une population de 99 allogreffés suivis à la Pitié ; parallèlement, le Dr Dhédin étudie actuellement l'influence des polymorphismes de *CX3CR1* dans notre population nancéenne.

Le double objectif est de progresser dans la connaissance de la physiopathogénie de la réaction du greffon contre l'hôte et de déterminer des facteurs pré-greffe prédictifs de l'évolution à l'échelon individuel, afin d'adapter la stratégie immunosuppressive ou la surveillance.

## V. REFERENCES

1. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, et al: The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells* 14:473-89, 1996
2. Bay JO, Cabrespine A, Peffault de Latour R: [Role of monoclonal antibodies in the treatment of acute graft versus host disease]. *Bull Cancer* 94:33-41, 2007
3. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, et al: Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90:3204-13, 1997
4. Holler E, Ertl B, Hintermeier-Knabe R, et al: Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymphoma* 25:217-24, 1997
5. Tsukada N, Kobata T, Aizawa Y, et al: Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 93:2738-47, 1999
6. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al: Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 349:2201-10, 2003
7. Leffell MS, Vogelsang GB, Lucas DP, et al: Association between TGF-beta expression and severe GVHD in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 33:485-6, 2001
8. Hildebrandt GC, Choi SW, Mueller G, et al: The absence of donor-derived IL-13 exacerbates the severity of acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 50:911-4, 2008
9. Bogunia-Kubik K, Duda D, Suchnicki K, et al: CCR5 deletion mutation and its association with the risk of developing acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 91:1628-34, 2006
10. Sackstein R: A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:2-8, 2006
11. Cardoso SM, DeFor TE, Tilley LA, et al: Patient interleukin-18 GCG haplotype associates with improved survival and decreased transplant-related mortality after unrelated-donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 126:704-10, 2004
12. Mullighan C, Heatley S, Doherty K, et al: Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 77:587-96, 2004
13. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME: Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:215-33, 2003
14. Shamim Z, Ryder LP, Heilmann C, et al: Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukin-7 receptor-alpha: prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 37:485-91, 2006
15. Middleton PG, Norden J, Cullup H, et al: Oestrogen receptor alpha gene polymorphism associates with occurrence of graft-versus-host disease and reduced survival in HLA-matched sib-allo BMT. *Bone Marrow Transplant* 32:41-7, 2003

16. Middleton PG, Cullup H, Dickinson AM, et al: Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 30:223-8, 2002
17. Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, et al: Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia* 23:545-56, 2009
18. Dickinson AM: Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: pre-transplant patient and donor factors: non-HLA genetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 20:189-207, 2007
19. Turner DM, Grant SC, Lamb WR, et al: A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. *Transplantation* 60:1113-7, 1995
20. Middleton PG, Taylor PR, Jackson G, et al: Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood* 92:3943-8, 1998
21. Cavet J, Middleton PG, Segall M, et al: Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood* 94:3941-6, 1999
22. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T, et al: Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29:569-75, 2002
23. Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH, et al: Tumour necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 76:1742-9, 2003
24. Cullup H, Dickinson AM, Jackson GH, et al: Donor interleukin 1 receptor antagonist genotype associated with acute graft-versus-host disease in human leucocyte antigen-matched sibling allogeneic transplants. *Br J Haematol* 113:807-13, 2001
25. Guasch JF, Bertina RM, Reitsma PH: Five novel intragenic dimorphisms in the human interleukin-1 genes combine to high informativity. *Cytokine* 8:598-602, 1996
26. Santtila S, Savinainen K, Hurme M: Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN\*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro. *Scand J Immunol* 47:195-8, 1998
27. MacMillan ML, Radloff GA, DeFor TE, et al: Interleukin-1 genotype and outcome of unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 121:597-604, 2003
28. Cullup H, Dickinson AM, Cavet J, et al: Polymorphisms of interleukin-1alpha constitute independent risk factors for chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 122:778-87, 2003
29. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, et al: Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72:1444-50, 2001
30. MacMillan ML, Radloff GA, Kiffmeyer WR, et al: High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 76:1758-62, 2003
31. Karabon L, Wysoczanska B, Bogunia-Kubik K, et al: IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum Immunol* 66:700-10, 2005

32. Cavet J, Dickinson AM, Norden J, et al: Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood* 98:1594-600, 2001
33. Socie G, Loiseau P, Tamouza R, et al: Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 72:699-706, 2001
34. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, et al: Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 26:1317-23, 2000
35. Cooke KR, Ferrara JL: A protective gene for graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 349:2183-4, 2003
36. Rocha V, Franco RF, Porcher R, et al: Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 100:3908-18, 2002
37. Kim DH, Lee NY, Sohn SK, et al: IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation* 79:1615-22, 2005
38. Dickinson AM, Holler E: Polymorphisms of cytokine and innate immunity genes and GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 21:149-64, 2008
39. Mlynarczewska A, Wysoczanska B, Karabon L, et al: Lack of IFN-gamma 2/2 homozygous genotype independently of recipient age and intensity of conditioning regimen influences the risk of aGVHD manifestation after HLA-matched sibling haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34:339-44, 2004
40. Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Wysoczanska B, et al: Recipient interferon-gamma 3/3 genotype contributes to the development of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 90:425-6, 2005
41. Brok HP, Heidt PJ, van der Meide PH, et al: Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Immunol* 151:6451-9, 1993
42. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, et al: Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 8:93-7, 1999
43. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, et al: Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 30:665-71, 2002
44. Reddy P, Teshima T, Hildebrandt G, et al: Pretreatment of donors with interleukin-18 attenuates acute graft-versus-host disease via STAT6 and preserves graft-versus-leukemia effects. *Blood* 101:2877-85, 2003
45. Murai M, Yoneyama H, Harada A, et al: Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 104:49-57, 1999
46. Ueha S, Yoneyama H, Hontsu S, et al: CCR7 mediates the migration of Foxp3+ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol* 82:1230-8, 2007
47. Dhédin N, Ghadiri A, Uzunov M, et al: Impact du polymorphisme génétique de la molécule CX3CR1 dans la survenue de la GVHD aigue cutanée, Congrès de la SFGM, 2007
48. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, et al: Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* 52:401-4, 1974

49. van Bekkum DW, Knaan S: Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction. *J Natl Cancer Inst* 58:787-90, 1977
50. Navari RM, Buckner CD, Clift RA, et al: Prophylaxis of infection in patients with aplastic anemia receiving allogeneic marrow transplants. *Am J Med* 76:564-72, 1984
51. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y: Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 20:530-7, 2008
52. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-7, 1997
53. Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6:9-20, 2006
54. Kelsall B: Getting to the guts of NOD2. *Nat Med* 11:383-4, 2005
55. Holler E, Rogler G, Herfarth H, et al: Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 104:889-94, 2004
56. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, et al: Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 107:4189-93, 2006
57. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, et al: Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation* 81:247-54, 2006
58. Granell M, Urbano-Ispizua A, Arostegui JI, et al: Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 91:1372-6, 2006
59. Mayor NP, Shaw BE, Hughes DA, et al: Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. *J Clin Oncol* 25:4262-9, 2007
60. Holler E, Hahn J, Andreesen R, et al: NOD2/CARD15 polymorphisms in allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors: T depletion matters. *J Clin Oncol* 26:338-9; author reply 339, 2008
61. Hildebrandt GC, Granell M, Urbano-Ispizua A, et al: Recipient NOD2/CARD15 variants: a novel independent risk factor for the development of bronchiolitis obliterans after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:67-74, 2008
62. Sairafi D, Uzunel M, Remberger M, et al: No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant* 41:961-4, 2008
63. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, et al: A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun* 68:6398-401, 2000
64. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25:187-91, 2000
65. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, et al: Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:384-7, 2001

- 
- 66.Kesh S, Mensah NY, Peterlongo P, et al: TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1062:95-103, 2005
- 67.Bochud PY, Chien JW, Marr KA, et al: Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 359:1766-77, 2008
- 68.Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, et al: Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 99:3524-9, 2002
- 69.Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, et al: Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 91:403-4, 1993
- 70.Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, et al: Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 352:1087-92, 1998
- 71.Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, et al: CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:993-1000, 2003
- 72.Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, et al: Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 93:3267-75, 1999