

Reconstitution Immunitaire
après
Greffe de Cellules Souches
Hématopoïétiques Allogéniques

AIH - Septembre 2006

N. Dulphy

INSERM U662 – Institut Universitaire d'Hématologie
Hôpital Saint-Louis
75010 Paris - France

La Greffe de CSH Allogéniques

- Objectifs :
 - Destruction de la Moelle Osseuse du **Receveur**.
 - Remplacement par la Moelle Osseuse et le Système Immunitaire du **Donneur**.

- Applications :
 - Cancers hématologiques
(leucémies, lymphomes...)
 - Pathologies hématologiques non-malignes
(aplasies, hémoglobinopathies...)

La Greffe de CSH Allogéniques

Processus de guérison de la greffe de CSH :

Deux mécanismes

- Effet myéloablatif et anti-tumoral de la chimio et de la radio-thérapie précédant la greffe.
- Capacité des cellules immunes du Greffon à reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses.
(Effet Graft versus Leukaemia, GvL)

Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

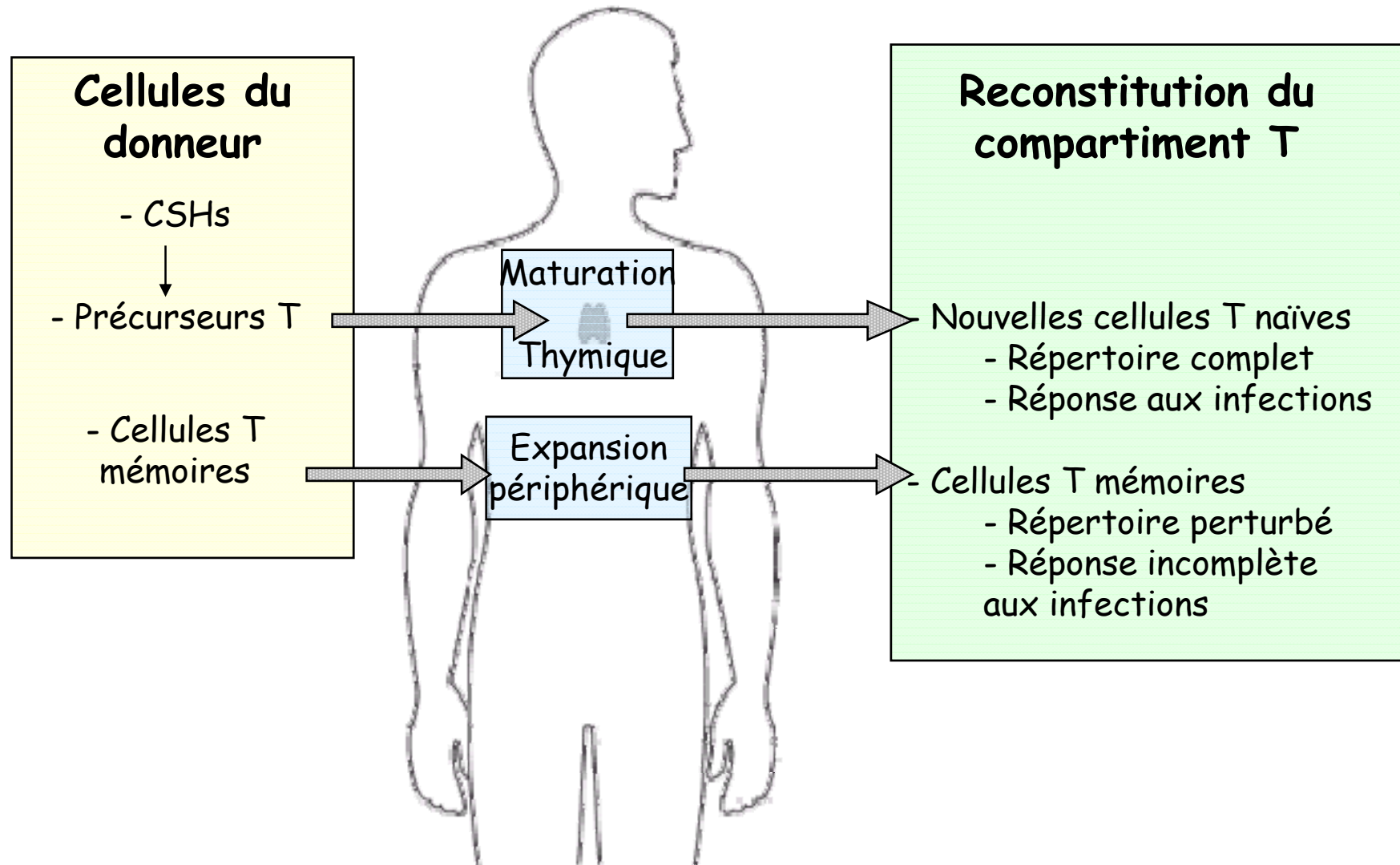
- Age, pathologie
- Type de greffe
 - moelle osseuse / sang placentaire / PBSC
 - manipulation du greffon (déplétion T)
 - greffe apparentée / non apparentée
 - greffe avec conditionnement réduit
- Evolution clinique (GVHD, infections)
- Polymorphismes génétiques (HLA et non-HLA)

Reconstitution Immunitaire : ce que l'on sait....

- DCs => Reconstitution précoce de DCs dérivées du Donneur (synchronisation avec la reconstitution myéloïde).
- Mph/Monos => Reconstitution dans les semaines qui suivent la greffe.
- PMN => Dans les 2-4 semaines post greffe.
- Ly.B => Fréquence de CD19⁺ réduite pdt 3 m. post HSCT.
- NK => CD56^{bright} avant les CD56^{dim} mais en quelques semaines.
- Ly.T => Nombre réduit de cellules T naïves – Nombre réduit de CD4⁺ (inversion CD4/CD8) – Faible diversité du répertoire T.

Reconstitution - Fonction thymique

Greffe de CSH



Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

- Cellules T naïves
 - réponse vis à vis de nouveaux antigènes de l'environnement
 - marqueurs phénotypiques
(CD45RA^{high}CD45RO⁻CD62L⁺CCR7⁺CD28⁺)
 - > 90% cellules T dans le sang de cordon,
80% (1 an)
70% (1-6 ans)
60% (7-17 ans)
60-40% (adulte).

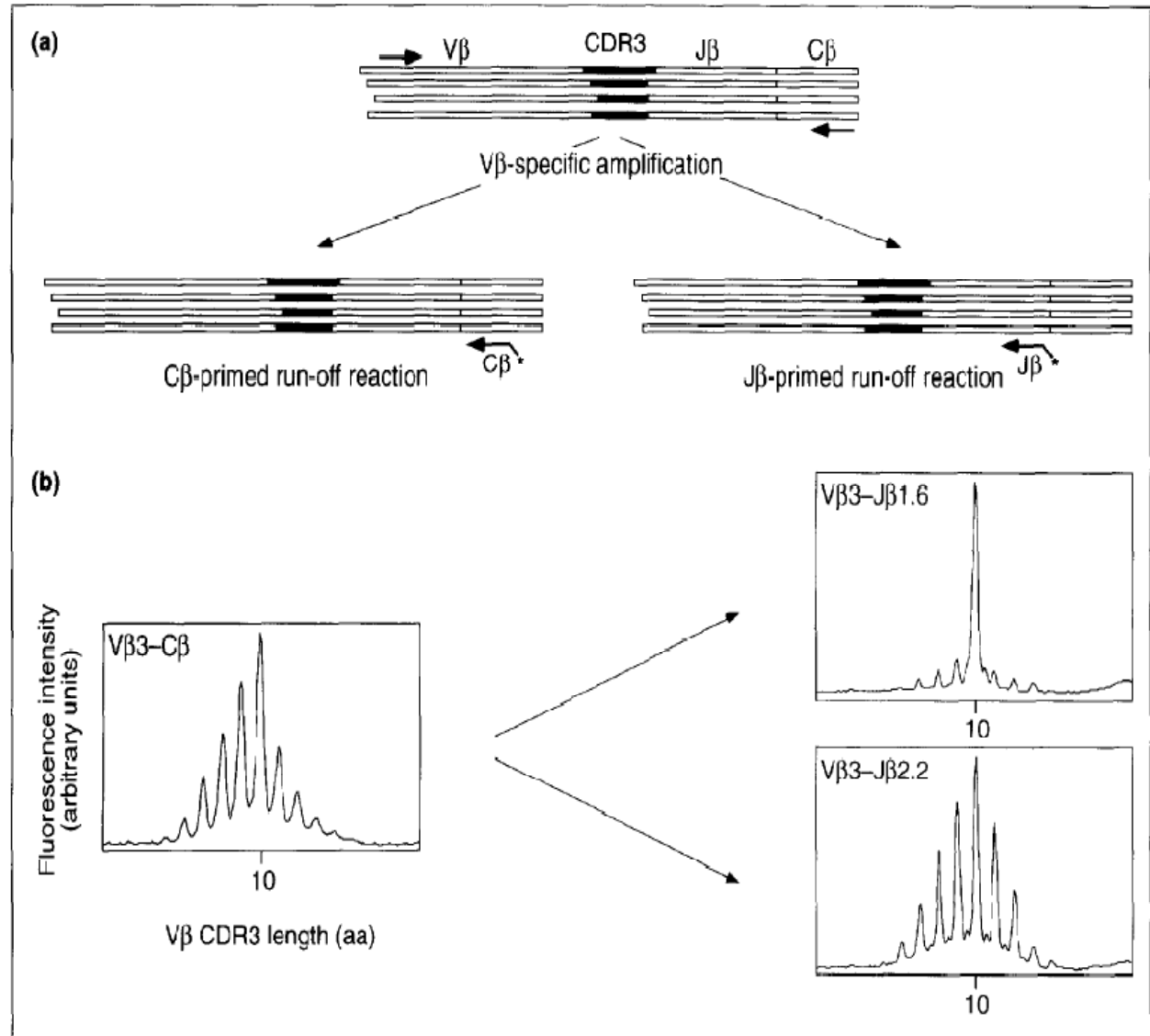
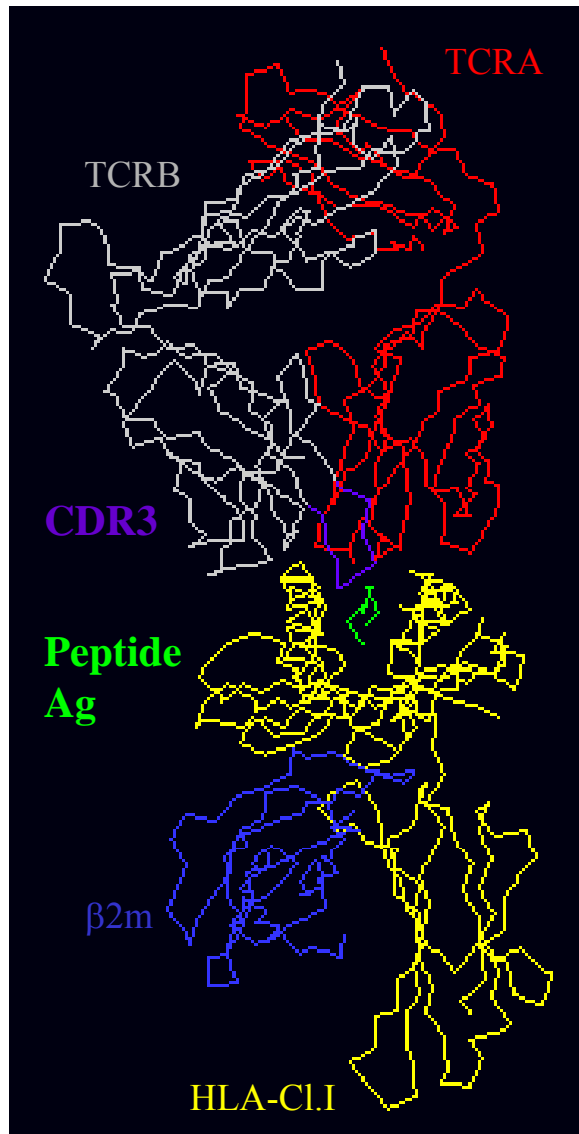
Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

- Homéostasie T naïfs/mémoires
 - interaction MHC/peptide nécessaire pour la survie des Ly. T naïfs
 - cytokines (Geginat *et al.* 2001. *J.Exp.Med.* **194**:1711)
 - IL-15 ↑ prolifération in vivo des CD8 mémoires
 - IL-7 ↑ prolifération CD8 naïfs et mémoires
 - IL-7 + IL-4 + self-MHC => survie et expansion des Ly. T naïfs

Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

- Les marqueurs de surface ne reflètent pas parfaitement la fonction :
 - les Ly. T naïfs peuvent avoir une longue durée de vie (→ 20 ans. *Weng et al., PNAS 1995; 92:11091*).
 - les Ly. T mémoires peuvent réverter vers un phénotype « naïf » CD45RA⁺ mais LFA-1^{high}CCR7^{low}.
- Evaluation directe de la diversité du TCR $\alpha\beta$:
 - Spectratyping (*Gorsky et al., J. Immunol. 1994; 152:5109*)
 - Immunoscope (*Pannetier et al., PNAS 1993; 90:4319*).

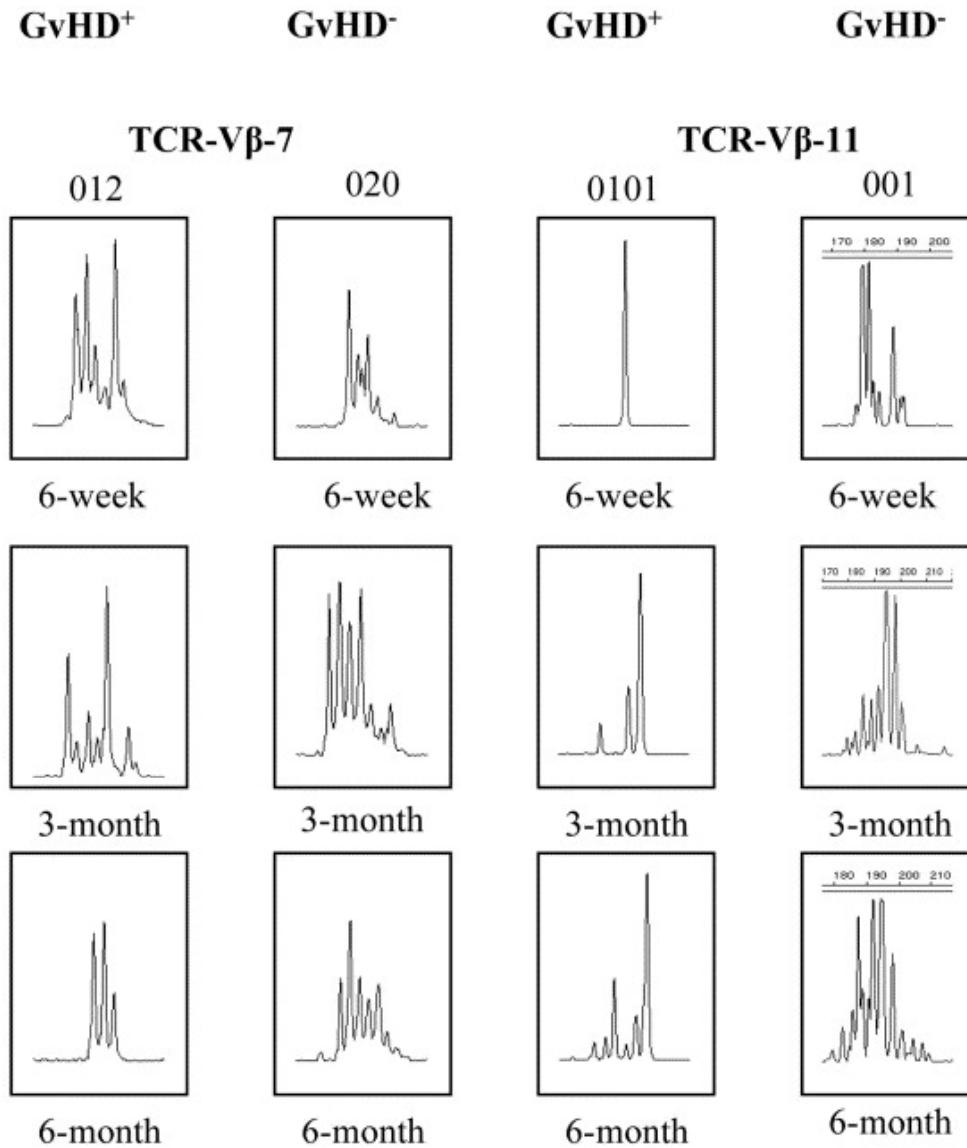
Immunoscope - Principles



Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

- Diversité du répertoire T fonction de:
 - Nombre et diversité des cellules T injectées avec le greffon (déplétion T, âge du donneur, type de greffe)
 - Cellules T résiduelles du Receveur
 - Fonction thymique (âge du Receveur)
 - Traitement immunosuppresseur et complications (GVHD, infections virales,...).

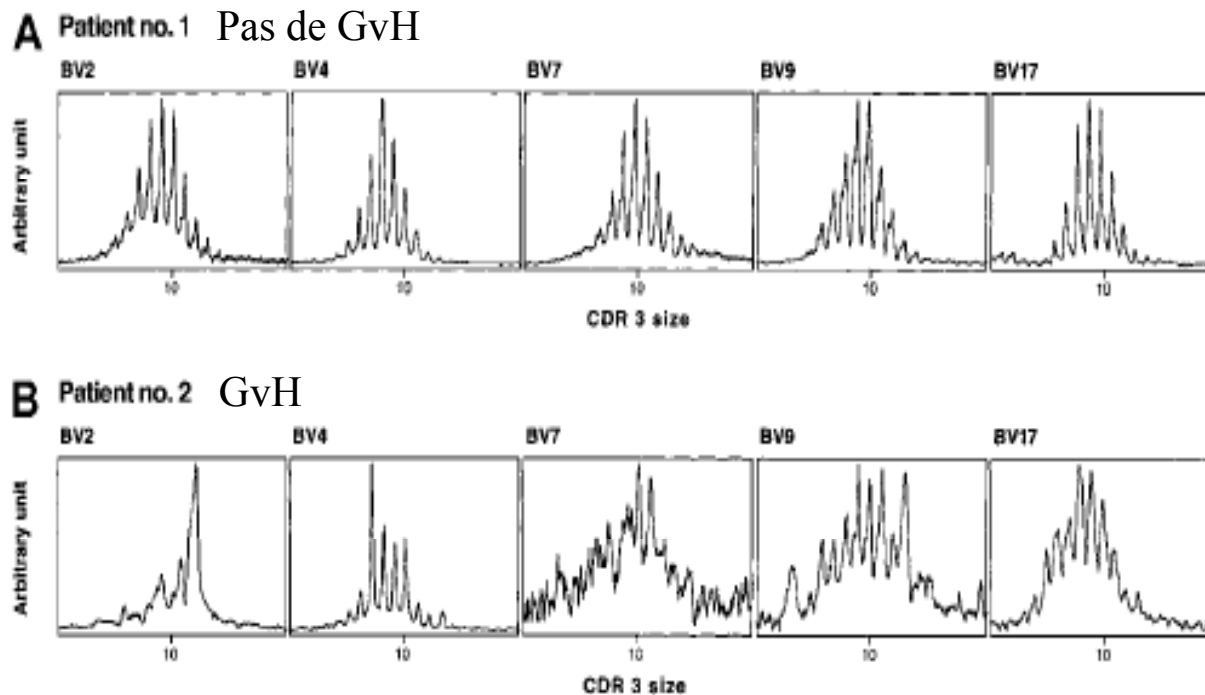
Lien entre GvH et Répertoire T après greffe de CSH



- Greffes Intrafamiliales de PBSC (T- dépletées)

⇒ Réduction de la diversité
du répertoire T au cours de
la reconstitution en cas de
aGvH.

Lien entre GvH et Répertoire T après greffe de CSH



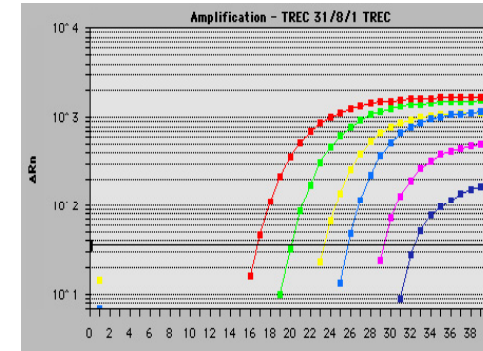
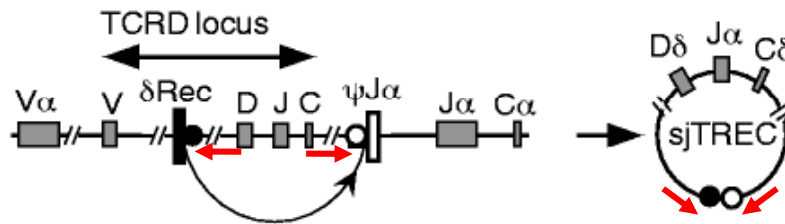
- 2 patients greffés (age-matched) avec des CSH de sang de cordon ombilical étudiés 2 ans après greffe :
 - => Impact de la GvH sur la reconstitution du répertoire T.

ANALYSE DE LA FONCTION THYMIQUE : TREC

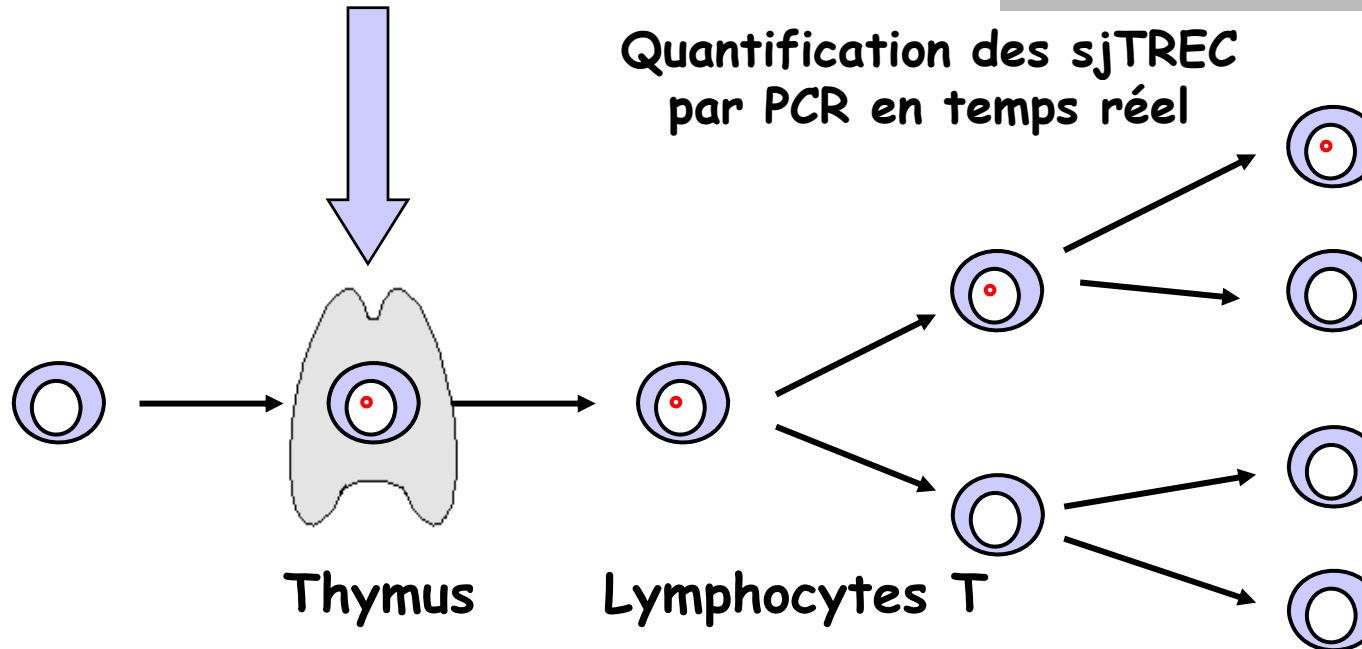
- analyse de la fonction thymique *ex vivo* par la mesure des “TREC” (“TCR rearrangement excision circles”) ou **cercles d’excision thymiques** produits lors de la recombinaison de la chaîne α du TCR.

T-cell receptor excision circles (TREC) Assay

Recombinaison du locus α



Quantification des sjTREC par PCR en temps réel



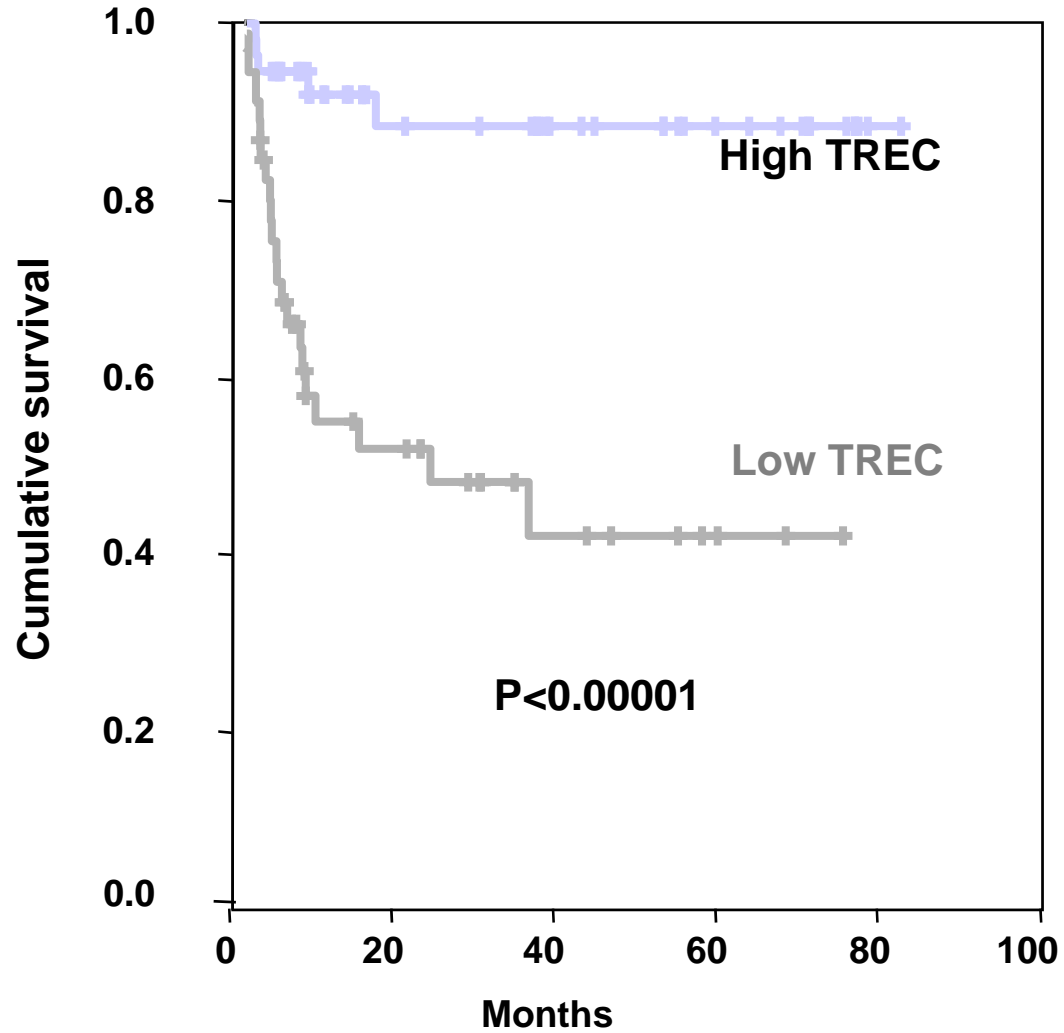
TREC et greffe de CSH

- Fonction thymique très altérée par la GVH
(Weinberg et al., *Blood* 2001 97: 1458).
- TREC bas durant 3 à 6 mois après greffe de CSH allogénique, rechute leucémique associée à une baisse du taux de TREC
(Hochberg et al., *Blood* 2001 98: 1116).
- Reconstitution efficace des populations lymphocytaires T à long terme après greffe de CSH de sang de cordon ombilical
(Talvensaari et al., *Blood* 2002 99: 1458).

TRECs et greffe de CSH

- Fonction diminue avec l'âge (25 ans \searrow)
(Douek *Nature* 1998; Steffens *Clin Immunol* 2000)
 - Grande variabilité chez les individus normaux
 - Age du receveur est un facteur pronostic de la greffe de CSH
- \Rightarrow Fonction thymique du receveur avant greffe est-il un facteur pronostique ?

TREC du receveur avant greffe et Survie



N=102

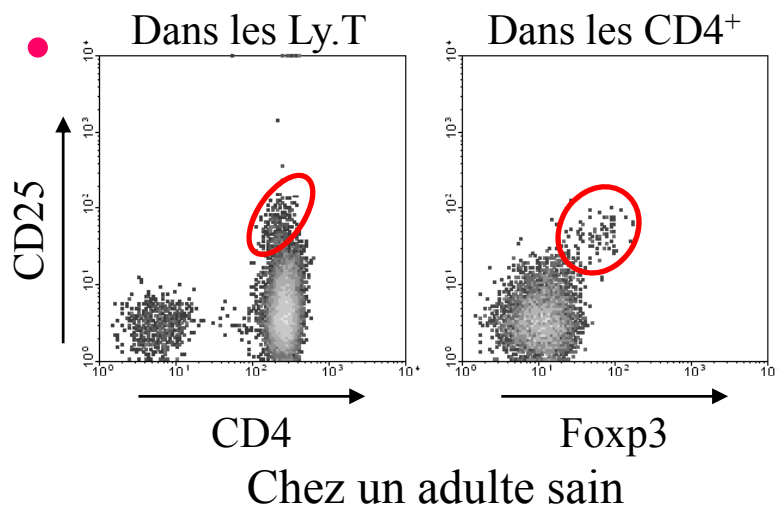
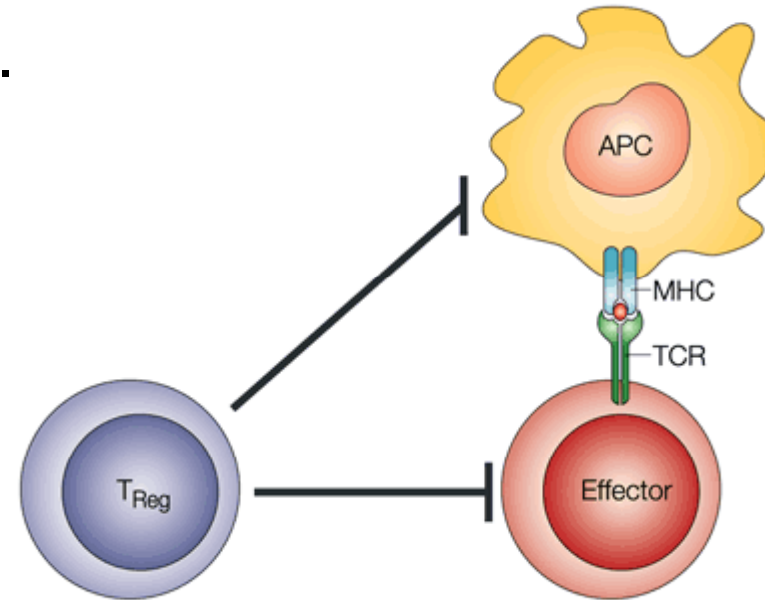
High TREC > 172 / 150 000 CD3+

TRECs et greffe de CSH

- Valeur **pronostique** de la fonction thymique du receveur avant greffe
 - => Identification des patients à risque
 - => Suivi accru de la GVH et des infections
- Hypothèses
 - => Reconstitution T **plus rapide**
 - Liens entre fonction thymique pré-greffe et la reconstitution immunitaire T chez l'enfant (Chen et al *Blood* 2004)
 - => Production de **Ly. T régulateurs** (Treg) dans le thymus
 - Relation entre TREC avant greffe et taux de Ly. T CD4⁺CD25⁺ (Miura et al *Blood* 2004)

Les Lymphocytes T régulateurs (Treg)

- Treg « naturels » / Tr1 inductibles et Ag spécifiques.
- Représentent 5% des T CD4⁺.
- Expriment CD25^{high} et CD62L.



Benefits:

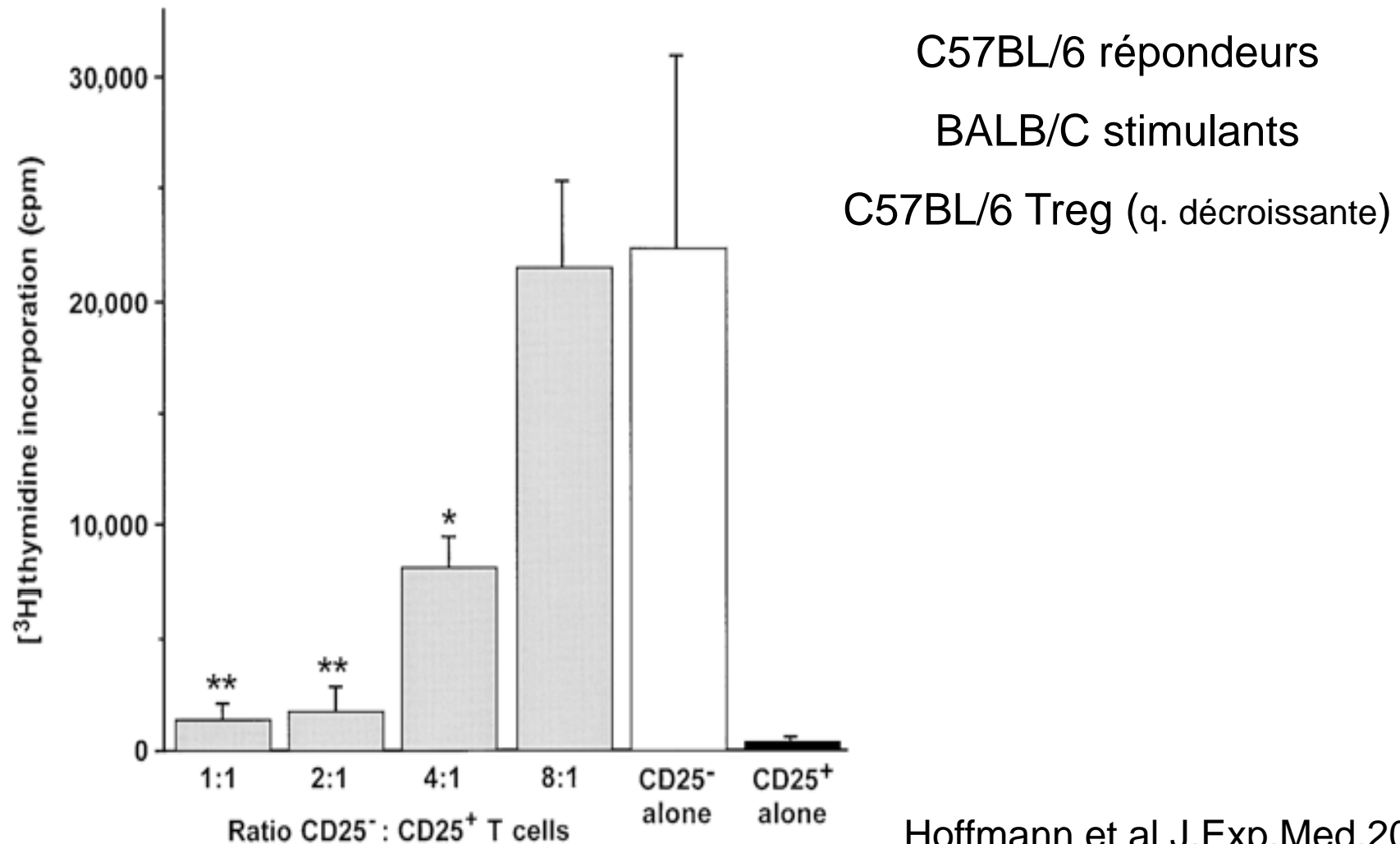
- T-cell homeostasis
- prevents autoimmune disease
- tolerance after transplantation
- prevents GVHD
- prevents allergy
- prevents hypersensitivity

Detrimental effects:

- down-regulation of tumour immunity
- down-regulation of immunity to infection

Les Ly. Treg inhibent la réponse T proliférative *in vitro*

B



Hoffmann et al J.Exp.Med.2002

Rôle des cellules T immunorégulatrices CD4⁺CD25^{high} en greffe de CSH allogénique

- Modèles murins:
 - Transfert de T_{reg} : limite la GVH et préserve l'effet GVL dans des modèles expérimentaux murins
(Cohen et al. 2002. *J.Exp.Med.* 196:401; Edinger et al. 2003. *Nat. Med.* 9:1144)
 - Le transfert de T_{reg} spécifiques favorise la reconstitution immunitaire
(Trenado et al. 2003. *J.Clin.Invest.* 112:1688)
 - Expansion et transfert de T_{reg} spécifiques d'Ag du Receveur : inhibition de la GVH et facilite la reconstitution immunitaire
(Trenado et al., 2006. *J. Immunol.* 176:1266)

Rôle des cellules T immunorégulatrices CD4⁺CD25^{high} en greffe de CSH allogénique

- Chez l'homme : données contradictoires
 - Origine thymique des Treg au stade DP
(Darasse-Jeze et al. 2005. *Blood*. **105**:4715)
 - ↓ Foxp3 en cas de GVH, corrélation taux de Foxp3 et fonction thymique
(Miura et al. 2004. *Blood*. **104**:2187)
 - Taux élevés de CD4⁺CD25^{high} en cas de cGVHD
(Clark et al. 2004. *Blood*. **103**:2410)

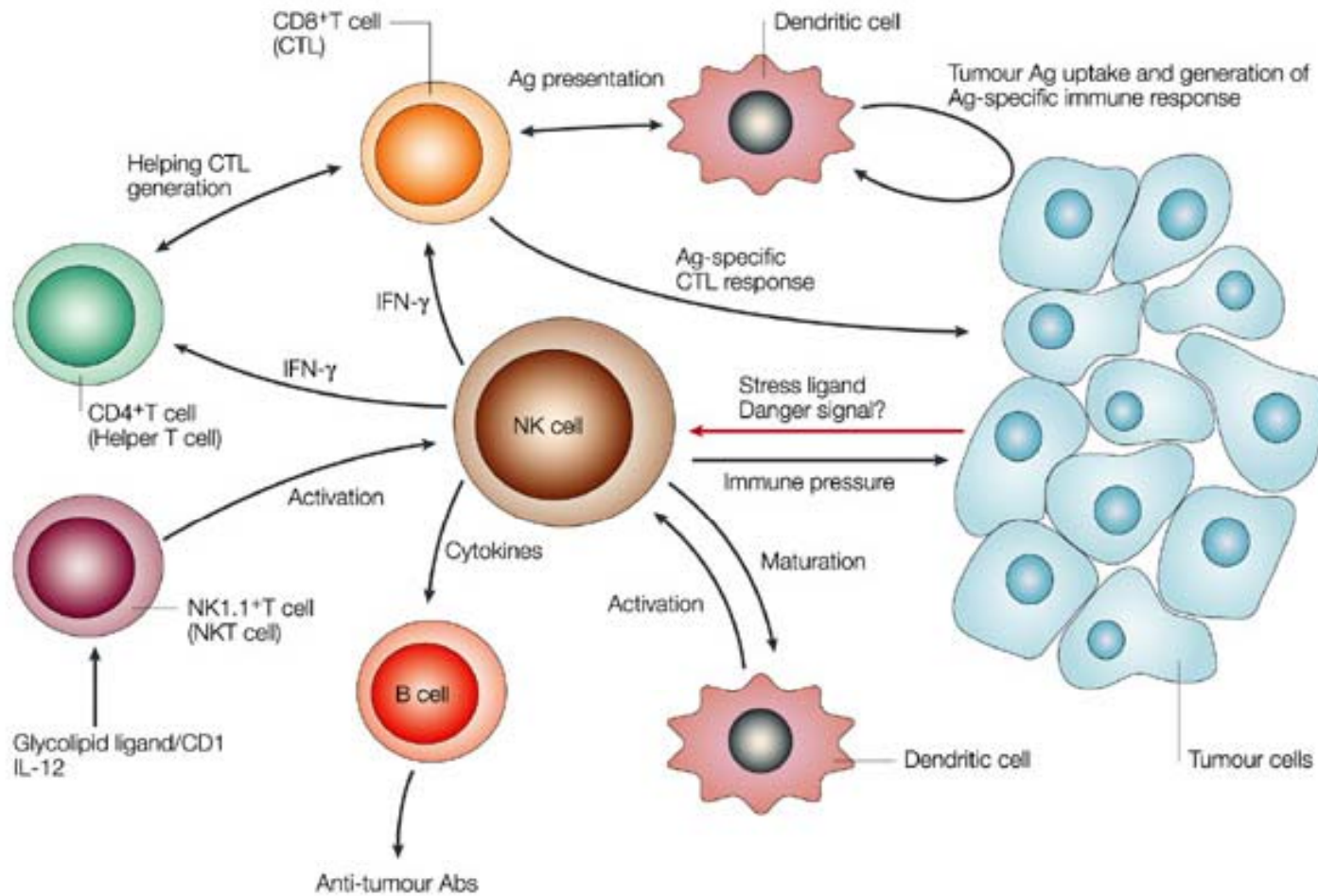
Rôle des cellules T immunorégulatrices CD4⁺CD25^{high} en greffe de CSH allogénique

- L'expansion *in vitro* des T_{reg} est possible et conserve leur propriétés suppressives
(Hoffmann *et al.* 2004. *Blood*. **104**:895).
- Les T_{reg} sont présentes dans le sang de cordon ombilical et peuvent être amplifiées en préservant leur capacité suppressive
(Godfrey *et al.* 2005. *Blood*. **105**:750).

Reconstitution des cellules dendritiques après greffe de CSH

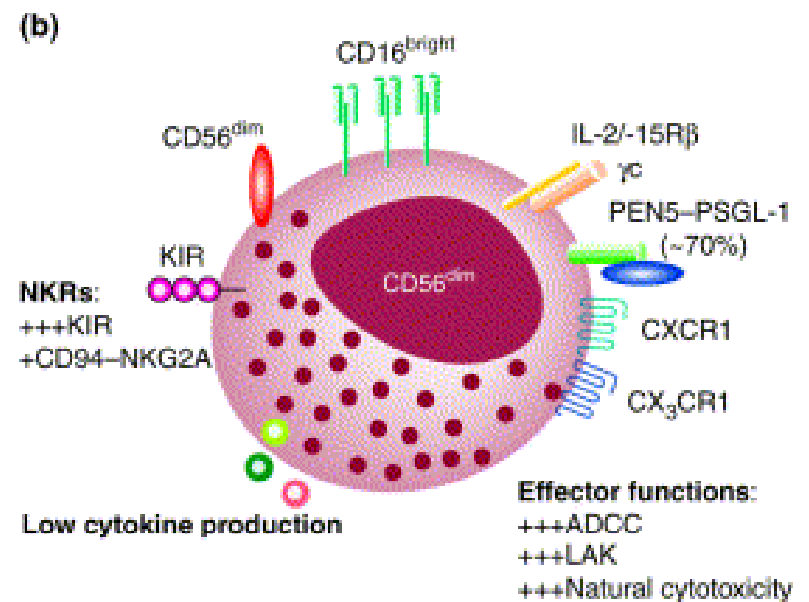
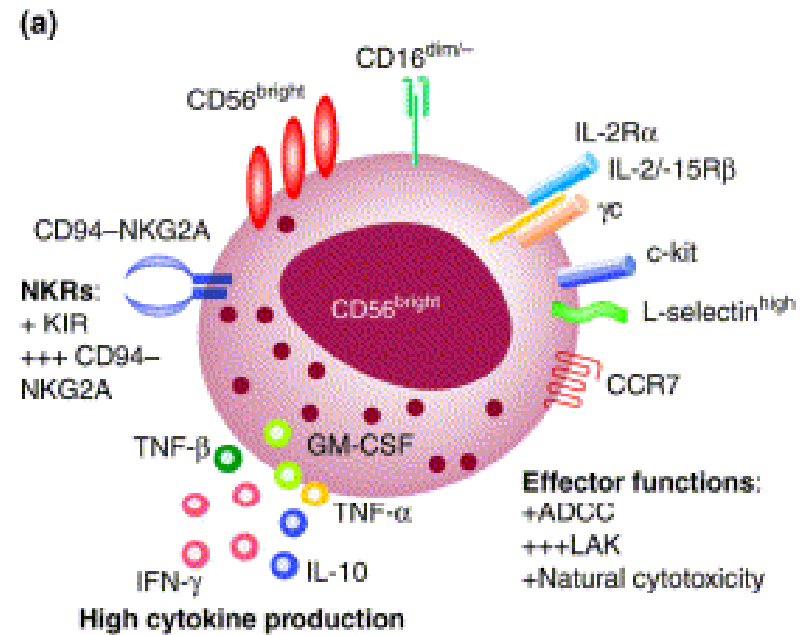
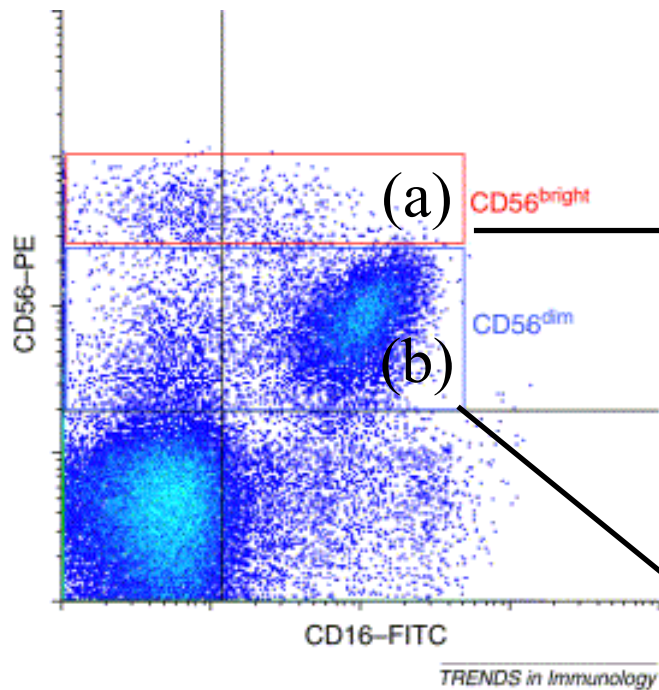
- GVHD associée à une persistance des populations DC du receveur (Shlomchik *et al.* 1999. *Science*. 285:412).
- Chimérisme de type donneur très rapide en périphérie en cas de greffe HLA génoidentique : 80% DC donneur à j.14; 95% à j.56 (Auffermann-Gretzinger *et al.* 2002. *Blood*. **99**:1442).
- C. de Langerhans : repopulation à j.40 en absence de GVHD; retardée à plus de j.100 si GVHD (Collin *et al.* 2006. *J.Exp.Med.* **203**:27).
- Mauvais Pc. d'un taux de DC bas (Reddy *et al.* 2004. *Blood*. **103**:4330).
- DC du donneur :
 - Reconstitution de type DC2 associée à une diminution de cGVH et de l'effet GVL (Waller *et al.* 2002. *Blood*. **97**:2948).
 - Balance DC1/DC2 fonction de la source de cellules souches (Arpinati *et al.* 2000. *Blood*. **95**:2484).

Stratégies de la Réponse Immunitaire Innée via les cellules NK



Données de base des Cellules NK

- Cellules Lymphoïdes de l'Immunité Innée.
- Capacité à lyser des cellules Tumorales sans stimulation préalable (immunisation ou pré-activation).
- Théorie du « Missing Self »
(par Ljunggren et Karre. 1990. *Immunol.Today*. **11**:237).
- Définies par l'expression de CD56 et l'absence de CD3.
- Cytokines immuno-régulatrices (TNF- α , IFN- γ , GM-CSF) et cytotoxicité (Naturelle et ADCC).



- Population NK : 10~15% des PBL

- Deux sous-populations :

(a) CD56^{bright} CD16^{-/dim} pour ~10%

(b) CD56^{dim} CD16^{bright} pour ~90%

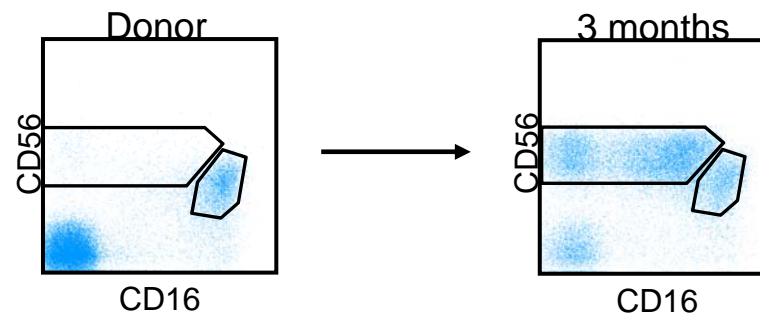
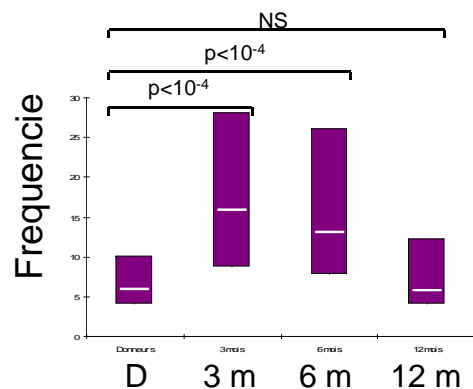
NB : CD16 est le Fc γ RIII

Récepteurs des Cellules NK

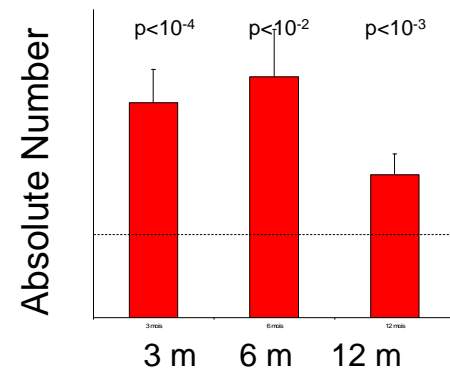
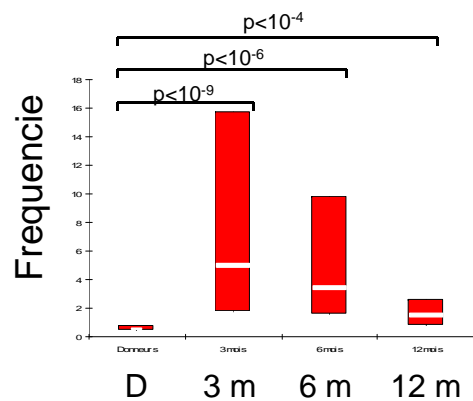
- Spécifiques des molécules HLA de classe I
 - KIR (Killer Immunoglobuline-like Receptor)
 - CD94/NKG2 (lectines de type C)
- Non-Spécifiques des molécules HLA de classe I
 - NCR (Natural Cytotoxicity Receptor : NKp30, NKp44, NKp46)
 - NKG2D (lectine de type C)
- Autres molécules régulatrices : 2B4, CD16, NKp80, CD40L, CD2, familles des ILTs, p75/AIRM,....

Equilibre entre les sous-populations NK post-greffe

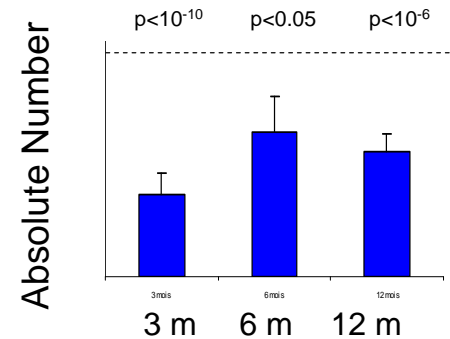
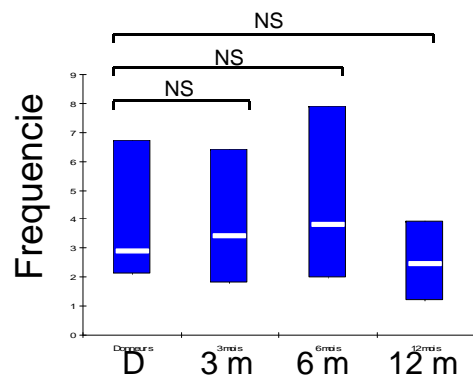
NK cells



CD56^{bright}



CD56^{dim}



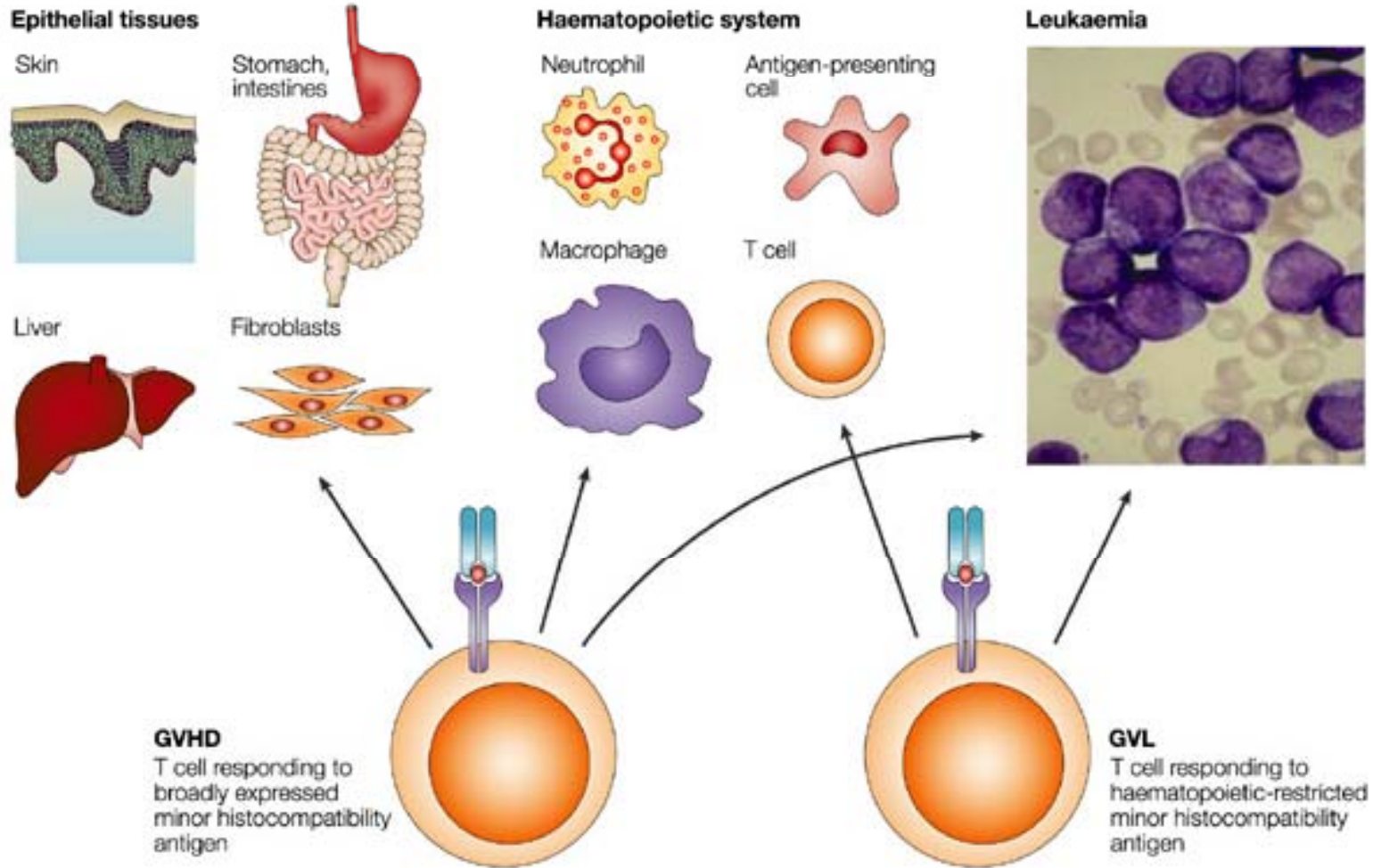
Paramètres de la reconstitution immunitaire après greffe de CSH

- Allogreffe de CSH est une immunothérapie:
 - induire un effet GVL pour prévenir la rechute.
- Les effets négatifs :
 - L'effet GVH
 - conditionnement
 - mHAgs
 - Reconstitution immunitaire insuffisante pour combattre les infections opportunistes.

GvL : observations

- Risque **réduit** de rechute chez les receveurs de CSH **allogéniques** par rapport
 - aux transplantations syngéniques
 - aux HSCT allogéniques T-dépletées.
- L'effet GvL est plus important chez les patients atteints de GvH.
- Effets bénéfiques des DLI chez les receveurs en rechute (20% à 80% de rémission suivant les pathologies).
- Cellules immunes en cause :
=> LT CD4⁺, LT CD8⁺, cellules NK

GvH et GvL



Antigènes Mineurs d'Histocompatibilité (mHAgs)

- Importance de la distribution tissulaire de l'expression du mHag :
 - => **Expression** différentielle sur des tissus variés (ubiquitaire vs. tissu hématologique)
 - => **Processing** différentiel en fonction du tissu ou du type cellulaire (protéasome vs. immuno-protéasome)
 - => Expression différentielle des molécules HLA (HLA de classe II) suivant le tissu ou l'inflammation.

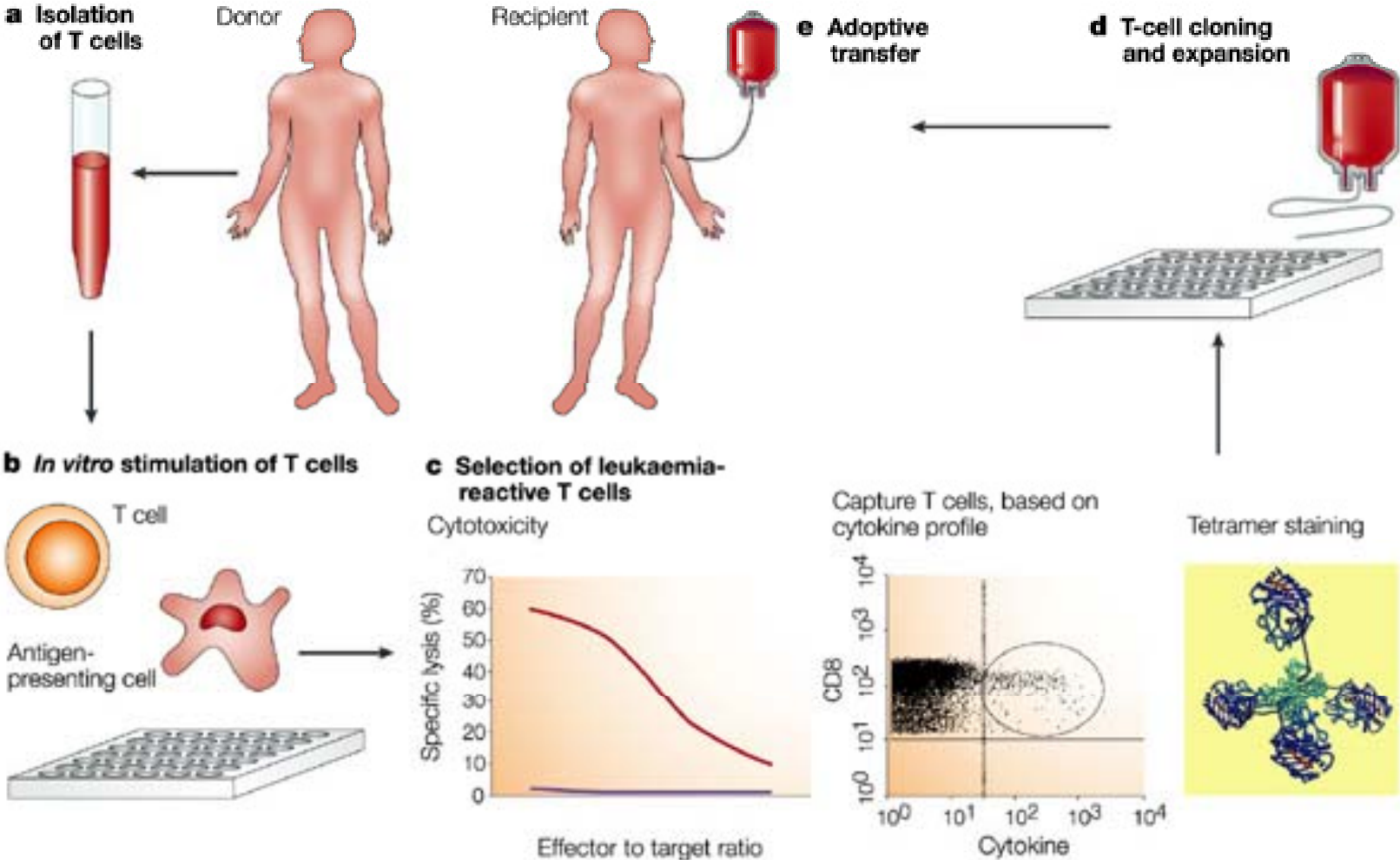
mHag expression	GVL	GVHD
Ubiquitous	+	+
Hematopoiesis	+*	(+) [†]
Cell lineage, specific	+*	-
Non-hematopoiesis restricted	-	+

*If the protein is not essential for tumor cell survival, selection and immune-escape of an antigen negative variant may occur.

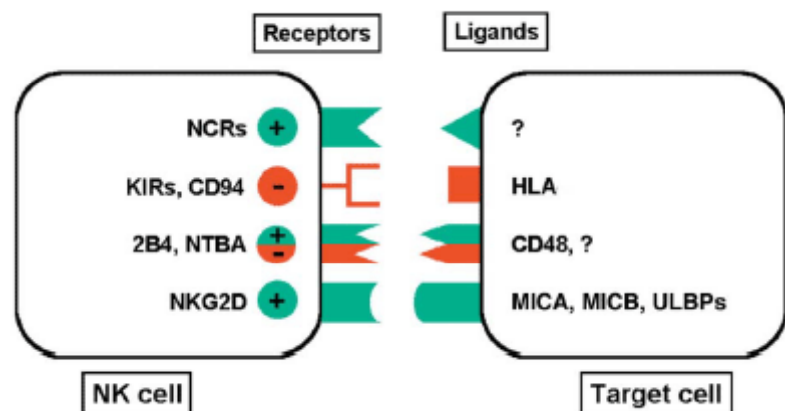
[†]Local inflammatory reactions may cause tissue damage.

GVHD, graft-versus-host disease; GVL, graft versus leukemia.

Immunothérapie adoptive par les cellules T

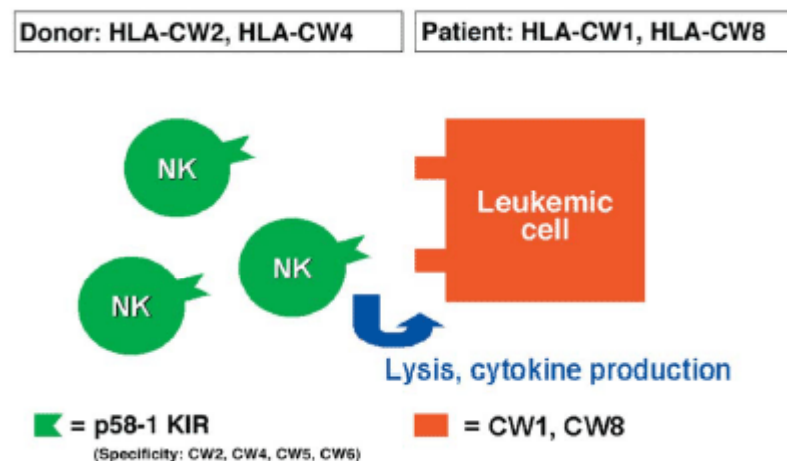


Effet GvL et Cellules NK



- Malgré la compatibilité HLA, il peut exister une incompatibilité NKR.

- L'incompatibilité NKR résulte d'une absence d'adéquation entre les KIR présents ou absents chez le Donneur et le typage HLA du Receveur.



De la surveillance biologique à l'Immunothérapie

- Modifications géniques des cellules du donneur
(HSV-tk gène suicide (Marktel et *al.*, *Blood* 2003;101:1290))
- Elimination des cellules T alloréactives des lymphocytes T du donneur ?
- mHA (HA-1) : utilisation comme Ag tumoral pour un effet GVL
(Mutis et *al.*, *Blood*, 1999; 93: 2336-2341) ?
- IL-7 pour stimuler la fonction thymique et la production de cellules T naives
(Okamoto et *al.*, *Blood* 2002; 99:2851) ?