



HAL
open science

Les cytokines homéostatiques, IL-7 et IL-15, au cours de l'allogreffe de CSH : leurs évolutions selon le conditionnement et leurs valeurs prédictives de la GVH aiguë et de la rechute

Stéphanie Thiant

► To cite this version:

Stéphanie Thiant. Les cytokines homéostatiques, IL-7 et IL-15, au cours de l'allogreffe de CSH : leurs évolutions selon le conditionnement et leurs valeurs prédictives de la GVH aiguë et de la rechute. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S040 . tel-00625482

HAL Id: tel-00625482

<https://theses.hal.science/tel-00625482>

Submitted on 21 Sep 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Lille 2
Faculté de Médecine et CHU de Lille
(Dérégulation de l'Homéostasie Lymphocytaire, EA2686, IFR114)

Année Universitaire 2010 – 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE
Pour l'Obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2
SPECIALITE : IMMUNOLOGIE

Présentée publiquement le 17 décembre 2010 par

Stéphanie, Dominique Thiant
Née le 11 juin 1984

**Les cytokines homéostatiques, IL-7 et IL-15,
au cours de l'allogreffe de CSH :**

Leurs évolutions selon le conditionnement et leurs
valeurs prédictives de la GVH aiguë et de la Rechute

Jury :

Professeur Jean-Paul Dessaint
Professeur Noel Milpied
Professeur Mohamad Mohty
Docteur Martin Guimond
Professeur Ibrahim Yakoub Agha
Docteur Myriam Labalette

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur

Directrice de thèse

Je dédie cette Thèse d'Université

A mon Grand Père, Marcel

Merci pour ton sourire chaque fois que je viens te voir et pour toutes les belles histoires de ta vie que tu me racontes du haut de tes 93 ans. Que Dieu te garde mon papi Gendarme.

A mes Parents, Edith et Dominique Thiant

Merci d'avoir été là pour moi chaque jour depuis 26 ans. Si je soutiens cette thèse aujourd'hui, c'est incontestablement grâce à vous et à votre soutien sans borne, vos coups de téléphone presque quotidiens ces derniers mois et votre disponibilité même à plus de 1000 km. A travers ce travail, j'espère vous rendre un peu de tout l'amour que vous m'avez apporté durant toutes ces années. Je vous aime...

A mon Frère, François, et ma Sœur, Caroline

Merci pour nos soirées, nos parties de belote, nos vacances, nos petits secrets et tous les moments que nous passons ensemble et qui nous rappellent qu'à trois, on n'est jamais seuls. Etre la grande sœur n'est pas toujours facile mais j'espère m'être montrée à la hauteur malgré nos chamailleries...

Merci à mon petit Franouch, pour les après midi que j'ai passé, enfant, à te regarder creuser des trous dans le sable à la plage sans que je ne comprenne jamais ce loisir, pour les défilés de mariés, pour notre passion commune du sauvetage aquatique et tant d'autres choses...

Merci à ma petite soeurette, pour nos séances maquillage, coiffure et essayage de vêtements. La porte est grande ouverte si tu veux me rejoindre à Montréal pour tes études.

Je vous adore et vous souhaite beaucoup de réussite dans tout ce que vous entreprendrez.

REMERCIEMENTS

A mon Président de Thèse et Directeur du Laboratoire d'Immunologie de Lille

Monsieur le Professeur J-P. Dessaint

Merci de m'avoir accueillie durant 4 ans dans votre laboratoire. J'ai beaucoup apprécié au cours de ces années votre disponibilité, votre capacité à gérer les problèmes avec calme et humour, vos compétences en statistiques qui m'ont toujours dépassée malgré tous les efforts fournis pour combler mes lacunes. Ce fut un honneur pour moi de vous avoir comme Président de Jury et un grand réconfort de savoir que vous n'auriez ainsi pas l'occasion de me poser trop de questions. Je vous prie de trouver dans ce manuscrit de Thèse, toute ma reconnaissance.

A ma Directrice de Thèse

Madame le Docteur Myriam Labalette

Pour votre investissement et votre enthousiasme dans les travaux de recherche que nous avons menés ensemble. Vos compétences et votre savoir ont permis l'aboutissement de cette Thèse d'Université. La première que vous ayez encadrée et je vous le souhaite la première d'une longue série toutes aussi passionnantes. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A mon Co Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha

Pour ton soutien au cours de ces trois ans de Doctorat, ton dynamisme et ton positivisme à toute épreuve. Merci de m'avoir ouvert les portes de ton univers médical, des congrès internationaux et des opéras viennois clandestins. Merci pour ces soirées interminables à rédiger des protocoles de recherche et des projets d'appel d'offre autour d'un kébab. Ce fut un honneur et un plaisir de travailler avec toi. De tout cœur, merci.

A mes Rapporteurs

Monsieur le Professeur Noel Milpied

J'aurais eu le plaisir de vous compter parmi deux jurys au cours de mon doctorat: le Prix PARI 2009 que vous m'avez remis et aujourd'hui la soutenance de ma Thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de juger mes travaux scientifiques.

Monsieur le Professeur Mohamad Mohty

Je suis très honorée de votre présence dans ce jury. Veuillez noter que je n'ai pas oublié de parler du rôle de l'IL-12, qui vous tient à cœur, dans le développement de la GVH aiguë. Preuve de ma reconnaissance et de mes remerciements pour votre présence parmi les membres du jury.

A mon Juge

Monsieur le Docteur Martin Guimond

Pour votre enthousiasme à la lecture des travaux de recherche que j'ai menés durant cette Thèse. Un grand merci pour votre traversée transatlantique qui vous a permise d'être membre de ce jury. Je suis très honorée de vous compter parmi nous. Vos travaux ont représenté une source de connaissance précieuse pour mes recherches. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma haute considération et de mon investissement prochain au sein de votre équipe.

A Monsieur Jacques Trauet, Technicien de recherche et Ami

Sans tes compétences et ton aide durant toutes ces années, rien n'aurait été possible. La pailasse m'aurait semblée bien vide et va me sembler bien vide ces prochains mois. Merci pour nos coups de gueule, nos éclats de rire, nos visites de musées viennois, nos trips tout terrain dans les bois, nos bouteilles de vins... Cette thèse est l'accomplissement de Notre travail mais aussi la découverte d'une belle amitié.

A Mesdames Dutriez Virginie, Véronique Lekeux, Naoual Sabaoui, Véronique Bétrancourt

Pour votre disponibilité, votre convivialité, vos anecdotes familiales quotidiennes qui rendent la vie drôle et agréable mais surtout merci pour vos gâteaux et friandises en tout genre! J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous Mesdames, même si je suis désormais contrainte à faire régime.

**A l'Ensemble du personnel du service HLA transplantation du Docteur Dufossé.
Et plus particulièrement à Lyly, Dom et Pascale.**

Votre collaboration et votre aide m'ont beaucoup aidée dans la réalisation de mes travaux. Merci d'avoir toujours été disponible avec le sourire. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

A l'Ensemble du personnel du service d'Immunologie Humorale du Docteur Sylvain Dubucquoi.

Je n'oublie pas que c'est dans votre service que j'ai commencé il y a 4 ans et demi. Merci à Sandrine Vuye sans qui je ne saurais toujours pas tenir une pipette. J'ai beaucoup apprécié ta patiente, ta gentillesse et ta disponibilité.

Merci à Carine Hauspie pour sa bonne humeur, nos après midi shopping, nos soirées filles...

Un Merci spécial pour le Grand schtroumpf, Sylvain Dubucquoi, notre maître à tous. Ta disponibilité et tes consultations gratuites m'ont été d'un grand secours tout au long de ces années. Sans toi et ton sens de la pédagogie, les « IgA » serait encore pour moi « l'inspection générale des aviateurs » et les lysozymes, le nom du dernier produit cosmétique à la mode.

Au Docteur Isabelle Top

Pour ton humilité, ta patiente, ton amitié. Tu as toujours été présente pour moi dans les moments de joie comme dans les instants plus difficiles de doutes et de tristesse. A la fois l'amie et la grande sœur que j'aurais aimée avoir. Prends soin de toi et de ton adorable famille.

A nos secrétaires, Laurence, Pascale et Sylvie pour leur patiente d'ange et leur disponibilité.

A l'ensemble des Internes ayant effectué un stage en Immunologie

Merci de m'avoir toujours accueillie comme l'une des vôtres, de m'avoir apportée votre soutien et votre joie de vivre.

A mes collègues en Master Recherche, Laurent Pascal et Mathilde Chérel

Merci pour votre compagnie, merci d'avoir accepté d'embarquer vous aussi dans la grande aventure de la recherche (ou grande galère selon les jours).

Résumé

Auteur : Stéphanie Thiant

Titre :

Les cytokines homéostatiques, IL-7 et IL-15, au cours de l'allogreffe de CSH :
Leurs évolutions selon le conditionnement et leurs valeurs prédictives de la GVH aiguë et de la Rechute.

Directeur de thèse : Docteur Myriam Labalette

Résumé

Les mécanismes assurant l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique veillent à préserver à la fois le nombre, la diversité et la qualité des cellules T qui le composent. Ces mécanismes sont fortement sollicités chez un receveur d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques puisqu'une déplétion initiale plus ou moins intense de son compartiment lymphocytaire périphérique est induite par le conditionnement pré-greffe. Le retour à l'homéostasie s'effectue grâce à la prolifération homéostatique des lymphocytes du donneur apportés par le greffon non manipulé, avant la reconstitution beaucoup plus tardive d'un compartiment lymphocytaire T naïf opérationnel, en fonction des capacités de thymopoïèse du receveur. L'IL-7 et l'IL-15, qui jouent un rôle majeur dans la survie des cellules T naïves et/ou mémoires, participent étroitement à l'expansion des cellules T induite par la lymphopénie et méritent à ce titre le qualificatif de cytokines homéostatiques.

Des protocoles de conditionnement d'intensité variable exposent à un risque équivalent de maladie du greffon contre l'hôte, sinon de rechute, en dépit de l'induction d'un degré variable d'inflammation. Ceci suggère que l'expansion homéostatique périphérique des lymphocytes T du donneur est un facteur déterminant de l'évolution bénéfique ou défavorable de l'allogreffe.

Une étude prospective de 107 patients répartis en deux cohortes, l'une après conditionnement myéloablatif, l'autre après divers protocoles de conditionnement d'intensité réduite nous a permis de comparer l'impact du degré de lymphopénie et d'inflammation sur les taux systémiques d'IL-7 et d'IL-15, l'expression de leurs récepteurs par les lymphocytes T circulants et l'évolution clinique.

Nous confirmons une évolution en miroir des taux plasmatiques d'IL-7 et de la lymphocytose et nous montrons que la cinétique des taux d'IL-7 post-allogreffe est semblable quelque soit l'intensité des protocoles de conditionnements utilisés. En revanche, si les taux d'IL-15 présentent une cinétique en miroir similaire à celle de l'IL-7, la valeur au pic et l'aire sous la courbe

d'IL-15 diffèrent nettement selon le type de conditionnement, mais sont fortement corrélés à la CRP plasmatique.

L'incidence des maladies aiguës du greffon contre l'hôte de grade 2 à 4 est similaire dans nos deux cohortes, mais le délai de survenue est plus tardif après un conditionnement réduit. Après analyse multivariée, notre étude permet de conclure à l'intérêt prospectif de la détermination précoce des taux plasmatiques d'IL-7 : dans les conditionnements myéloablatifs, un taux d'IL-7 supérieur à 11,9 pg/mL à J+14 est prédictif, tandis que dans les conditionnements réduits, c'est un taux supérieur à 5,9 pg/mL à J+30 qui s'avère prédictif. Dans notre cohorte de patients sous conditionnement myéloablatif, de faibles taux d'IL-15 à J+14 sont associés en analyse univariée et multivariée à la survenue ultérieure d'une rechute de l'hémopathie maligne. Une relation similaire mais plus tardive (J+90) est retrouvée chez les receveurs d'un conditionnement réduit.

Outre l'intérêt prospectif pour les patients de la détermination précoce des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15, cette étude comparative a permis de cerner d'une part le rôle essentiel de la lymphopénie dans l'accumulation d'une concentration critique d'IL-7 nécessaire pour piloter l'expansion homéostatique des cellules T matures et, d'autre part l'impact du contexte inflammatoire sur l'augmentation de la concentration plasmatique d'IL-15. Celle-ci, par son action directe sur les l'expansion des cellules T CD8⁺ mémoires et ses effets contributifs à l'expansion homéostatique des cellules T naïves, apparaît renforcer l'action de l'IL-7 en potentialisant son rôle dans l'alloréactivité, bénéfique en terme de protection vis-à-vis de la rechute mais délétère en terme de réaction de greffon contre hôte.

Mots clés

Homéostasie, Interleukine-7, Interleukine-15, Lymphocyte T, Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, GVH aiguë, Rechute.

Discipline Administrative

Immunologie

Adresse du Laboratoire

Laboratoire d'Immunologie, EA 2686, Centre de Biologie Pathologie, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59 037 Lille cedex.

Liste des abréviations utilisées

Ac : anticorps
Ag : antigène
CCR7 : récepteur de CC-chimiokines de type 7
CD : cluster de différenciation
CI : intervalle de confiance
CLP : compartiment lymphocytaire T périphérique
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSP : cellules souches périphériques
CV : coefficient de variation
FITC : Fluorescéine Iso Thio Cyanate
GVHD : Graft versus Host Disease
GVL : Graft versus Leukemia
HLA : Human Leukocyte Antigen
ICT : Irradiation Corporelle Totale
IFN- γ : interféron gamma
IL : interleukine
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
MFI : intensité médiane de fluorescence
mHA : antigène mineur d'histocompatibilité
MA : myéloablatif
MO : moelle osseuse
PC5 : phycoérythrine-cyanine 5
PC7 : phycoérythrine-cyanine 7
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
PE : phycoérythrine
Pg/mL : picogrammes par millilitre
RIC : conditionnement d'intensité réduite
SNPs : polymorphismes nucléotides simples
T_N : lymphocyte T naïfs
T_{CM} : lymphocyte T mémoire centrale
T_{EM} : lymphocyte T effecteur mémoire
T_{TD} : lymphocyte T différenciation terminale

% : pourcentage
< : inférieur à
> : supérieur à

PARCOURS PERSONNEL

- Septembre 2007- 2010 : **Thèse Universitaire** en Immunologie de l'allogreffe financée par une allocation de recherche par le Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT)
- Juin 2007 : **Lauréat du Master 2^{ème} année Biologie et Santé** « Physiologie, Physiopathologies et Pharmacologie des systèmes intégrés et neurosciences »
- Juin 2006 : **Master I « Physiologie, Sciences du Sport »** Faculté des STAPS de Liévin
- Juin 2006 : Licence « Entraînement sportif » Faculté des STAPS de Liévin
- Juin 2005 : Licence « Education et Motricité » Faculté des STAPS de Liévin
- Juin 2003 : Professorat des Ecoles
- Juin 2002 : Baccalauréat Scientifique - Option Sciences de la vie et de Terre (Mention Bien)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Participation aux congrès : Communication Orale

21-22 Octobre 2010 : Société Française de Greffe de Moelle, Paris France

« *Partial Selective CCR7+/CD4+ T-Cell Depletion Does Not Affect Donor Acquired Anti-Infection Immunity* »

29 Mars-1^{er} Avril 2009 : 35th annual meeting of European group for Blood and Marrow Transplantation, Göteborg Suède

« *Correlation between plasma interleukin-7 and interleukin-15 levels and acute graft-versus-host disease and relapse in patients undergoing myeloablative allogeneic stem cell transplantation* »

Participation au congrès : Présentation affichée

4-7 Décembre 2010: 52^{ème} Congrès annuel de l'American Society of Hematology, Orlando, Floride

« *Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation and relationship to acute GVHD* »

« *The polymorphism +510 of IL-7Ralpha chain is correlated with the increase of plasma levels of IL-7 in the first month after hematopoietic stem cells transplantation* »

29-30 Octobre 2009: Société Française de Greffe de Moelle, Paris France

« *Plasmatic level of interleukin-7 and interleukin-15 in the first month post-graft of bone marrow transplantation are predictive of Acute Graft-Versus-Host Disease and Relapse* »

13-16 Septembre 2009: European Congress of Immunology, Berlin Germany

« *Plasmatic level of interleukin-7 and interleukin-15 in the first month post-graft of bone marrow transplantation are predictive of Acute Graft-Versus-Host Disease and Relapse* »

25-27 Novembre 2008: Congrès SFI (Société française d'Immunologie), Unesco Paris France

« *Immune Reconstitution Following Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: The Impact of Expanding CD28negative CD8⁺ T Cells on Relapse* »

26-29 Novembre 2007 : Congrès SFI, Ecole normale supérieure de Lyon France

« *The Expression of IL-7R α (CD127) and IL-2/15R β (CD122) on CD4⁺ and CD8⁺ naïve and memory T cells in healthy adults is independent of T cells numbers and IL-7 and IL-15 levels* »

Publications scientifiques :

- S. Thiant, I Yakoub-Agha, L Magro, J Trauet, V Coiteux, JP Jouet, JP Dessaint, and M Labalette. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative bone marrow transplantation are predictive biomarkers of acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Oct;45(10):1546-52
- S Thiant, M Labalette, J Trauet, V Coiteux, E Berranger, JP Dessaint, I Yakoub-Agha. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation and relationship to acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* (in press)

Collaboration établie au cours de la thèse :

Etude du polymorphisme de l'IL-7R α en transplantation de cellules souches hématopoïétiques en collaboration avec le Professeur Klaus Müller, Paediatric Clinic II, 4064, Rigshospitalet, Blegdamsvej 9, Copenhagen DK-2100

PRIX SCIENTIFIQUE

- Travel Award par l'American Society of Hematology pour le 52^{ème} Congrès annuel, Orlando, Floride 4-7 Décembre 2010.

Ce Prix est décerné aux étudiants, jeunes chercheurs et étudiants en médecine dont les présentations poster ou orales ont été sélectionnées afin de les aider à financer leur déplacement pour le congrès.

- Prix PARI (Prix Amgen pour la Recherche et l'Innovation en thérapie cellulaire) en Novembre 2009.

« Homéostasie des lymphocytes T et reconstitution immunitaire chez des receveurs de cellules souches hématopoïétiques : rôle des cytokines homéostatiques (IL-7, IL-15) et expression de leur récepteur par les sous populations de cellules T naïves et mémoires »

Depuis sa création en 2006, le Prix Amgen pour la Recherche et l'Innovation (PARI) a permis d'aider de jeunes chercheurs et cliniciens à réaliser et poursuivre leurs projets scientifiques. Le PARI s'inscrit dans la volonté commune d'Amgen et de la SFMG-TC de révéler de nouvelles compétences dans le domaine de l'hématologie et de la greffe avec, en perspective, la découverte de nouveaux traitements pour les patients atteints de pathologies graves.

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

2007- 2010 : Monitrice à l'Université Droit et Santé, Lille Nord de France

2004-2006 : Professeur des écoles titulaire (en disponibilité pour étude depuis septembre 2006)

2003-2004 : Formation à l'enseignement primaire à l'IUFM (Institut Universitaire de Formation des Maîtres) d'Arras

Table des Matières

INTRODUCTION	1
1) Les grands mécanismes d'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique	2
1.1. Caractérisation immunophénotypique des cellules T naïves et mémoires chez l'Homme	2
1.1.1. Les lymphocytes T naïfs	2
1.1.2. Les lymphocytes T mémoires.....	4
1.1.3. L'évolution naturelle des compartiments naïf et mémoire.....	5
1.2. Les grandes voies de régénération du CLTP après lymphodéplétion intense	6
1.2.1. Les trois grandes voies de régénération identifiées dans les modèles animaux	7
1.2.2. Les grandes voies de régénération du CLPT chez l'Homme.....	9
2) Le rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T	11
2.1. L'interleukine-7 (IL-7)	14
2.1.1. Structure et production de l'IL-7.....	14
2.1.2. Structure et expression cellulaire de la sous-unité α du récepteur à IL 7 (IL-7R α)	15
2.1.3. Voies de signalisation du récepteur hétérodimérique engageant l'IL-7	17
2.1.4. Les interconnexions du récepteur et des voies de transduction modulant la fonctionnalité de l'IL-7	19
2.1.5. Régulation de l'expression de l'IL-7R α selon la biodisponibilité de l'IL-7	21
2.2. L'interleukine 15 (IL-15)	22
2.2.1. Structure de l'IL-15.....	22
2.2.2. La chaîne α du récepteur à l'IL-15 (IL-15R α) et son interaction avec l'IL-15.....	24
2.2.3. La trans-présentation de l'IL-15	25
2.2.4. La réponse à l'IL-15 soluble	27
2.2.5. Signalisation par le récepteur après engagement de l'IL-15.....	30
3) Contribution des cytokines homéostatiques au maintien ou au rétablissement de l'homéostasie des cellules T	31
3.1. Le rôle de l'IL 7 dans le maintien homéostatique des cellules T naïves	32
3.2. Modes d'action de l'IL 7 dans le contrôle de l'expansion homéostatique des cellules T naïves	33
3.2.1. L'effet prolifératif de l'IL-7 à concentration élevée	33
3.2.2. Une expansion relativement moindre des cellules T CD4 ⁺ naïves.....	34
3.3. Le rôle des cytokines homéostatiques dans l'homéostasie des cellules T mémoires	36
3.3.1. Les cellules T CD4 ⁺ mémoires : rôle majeur de l'IL-7	37
3.3.2. Les cellules T CD8 ⁺ mémoires : rôle de l'IL-7 et de l'IL-15 selon l'expression ou non de la chaîne IL-2/15R β	37
3.3.3. L'expansion prédominante des cellules T CD8 ⁺ mémoires.....	38
3.4. Les autres cytokines contribuant à l'homéostasie du CLTP	39
3.5. En conclusion, on peut discerner deux composantes dans l'homéostasie globale du CLTP tout au long de la vie	40
4) L'impact des cytokines homéostatiques après l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)	42
4.1. Les lymphocytes transférés sont confrontés dans le contexte de l'allogreffe à des molécules étrangères, différentes du « soi » du donneur qui a régi la sélection négative de ses cellules T	43
4.2. Les populations cellulaires T impliquées dans la GVH	45
4.3. Les effets bénéfiques ou délétères de l'alloréactivité	46
4.4. L'effet de l'inflammation induite par les conditionnements	48
4.4.1. Rôle de l'inflammation aux temps précoces post-greffe	48
4.4.2. Résolution progressive de l'inflammation et possibilités de complications tardives post-greffe	50
4.5. L'intensité du conditionnement détermine le degré de lymphopénie et le degré d'inflammation	51
4.6. Impact des cytokines homéostatiques sur les événements post-greffe	52
4.6.1. IL-7 et événements post-greffe.....	53
4.6.2. IL-15 et événements post-greffe.....	53
4.6.3. IL-12 et événements post-greffe.....	54
5) Les objectifs de nos études chez les receveurs d'allogreffe de CSH	55

MATERIEL ET METHODES	56
1) Sujets	57
2) Dosage de l'IL-7, l'IL-15, l'IL-2R α et de la protéine C-Réactive (CRP).....	58
3) Expression des récepteurs de cytokines homéostatiques: IL-7R α (CD127) et IL-15/2R β (CD122)	58
4) Détection des polymorphismes nucléotides simples (SNPs) par amplification spécifique de séquence en PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase).....	62
5) Statistiques.....	63

RESULTATS	64
------------------------	-----------

<i>Partie 1 : Taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 et expression des chaînes IL-7Rα (CD127) et IL-2/15Rβ (CD122) par les sous-populations de lymphocytes T naïfs et mémoires chez les sujets adultes sains et en situation d'homéostasie lymphocytaire.</i>	65
--	-----------

1) Composition du CLTP et taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15.....	65
2) Expression de l'IL-7R α (CD127) et de l'IL-2/15R β (CD122) à la surface des sous-populations lymphocytaires T	67
2.1. Hétérogénéité d'expression du CD127 à la surface des sous-populations de cellules T CD8 ⁺ différenciées.....	67
2.2. Expression membranaire du CD127 par cellules T et taux plasmatiques d'IL-7	68
2.3. Faible proportion de cellules CD122 ⁺ dans le compartiment T	69
2.4. Corrélation entre l'expression du CD127 et du CD122 sur les lymphocytes T CD8 ⁺ différenciées CCR7 ^{neg}	70
3) Discussion et conclusion.....	71

<i>Partie 2 : Impact de la variation des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 sur le devenir de l'allogreffe de moelle osseuse et la repopulation du CLTP après conditionnement myéloablatif.</i>	75
---	-----------

1) Données publiées.....	75
2) Données complémentaires	76

<i>Partie 3 : Impact de la variation des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 sur le devenir de l'allogreffe de CSH et la repopulation du CLTP après conditionnement d'intensité réduite.</i>	78
---	-----------

1) Données publiées.....	78
2) Données complémentaires	79

***Partie 4 : Analyse comparative des taux d'IL-7 et d'IL-15, du contexte inflammatoire et de la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë en fonction de l'intensité du conditionnement*..... 82**

1) Variations de la lymphocytose et de la composition du compartiment lymphocytaire T depuis le conditionnement pré-greffe jusqu'à J+90 post-greffe.....	84
1.1. Evolution de la lymphocytose T	84
1.2. Rapport CD4/CD8 à J+30 post-greffe en fonction du conditionnement.....	85
1.3. Composition du compartiment lymphocytaire T en cellules T naïves et mémoires chez les receveurs à J+30 post-greffe, comparé aux sujets sains	86
2) Comparaison des taux d'IL-7 et d'IL-15 chez les patients en fonction du type de conditionnement chez les 107 receveurs	87
3) Comparaison de l'expression de l'IL-7Rα et de l'IL-2/15Rβ sur les sous-populations T naïves et mémoires selon le type du conditionnement	88
4) Comparaison du degré d'inflammation chez les receveurs en fonction du type de conditionnement	90
5) Valeur prédictive globale des taux d'IL-7 pour la survenue ultérieure d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë	92

***Partie 5 : Association du polymorphisme nucléotidique simple +510 (rs-1494558) du gène de l'IL-7R α au risque de maladie du greffon contre l'hôte.....* 95**

***DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION*..... 98**

***BIBLIOGRAPHIE*..... 109**

INTRODUCTION

L'homéostasie (du grec *homoios*, « similaire », et *histēmi*, « immobile ») est un concept défini en 1850 par Claude Bernard. Il se définit comme la capacité d'un système à conserver son équilibre interne de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures qu'il subit. Appliqués au système immunitaire, les mécanismes homéostatiques permettent de préserver à la fois le nombre, la diversité et la qualité des cellules qui le composent.

Au sein de ce système immunitaire, le compartiment des lymphocytes T occupe une place de choix. Il se divise sur le plan anatomique et fonctionnel en deux grands ensembles : un compartiment central, principalement le thymus où se déroule l'ontogénie des cellules T, et un compartiment périphérique, où les cellules T matures évoluent pour assurer pleinement leur mission de défense de notre organisme.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique (CLTP) et plus particulièrement à sa population dite « conventionnelle », composée de cellules T exprimant un récepteur clonotypique de type $TCR\alpha\beta$. Ainsi, le CLTP regroupe l'ensemble des populations de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, naïves et mémoires, présentes dans le sang, la lymphe, les tissus et les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions, la rate et les formations lymphoïdes associées aux muqueuses. Les lymphocytes T différenciés, effecteurs ou mémoires, peuvent s'extravaser pour infiltrer les tissus et organes non lymphoïdes.

1) Les grands mécanismes d'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique

L'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique est indispensable au bon fonctionnement du système immunitaire. Chacun de ses principaux sous-compartiments (lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et au sein de ceux-ci, cellules T naïves et cellules T mémoires) doit être préservé aussi bien sur un plan quantitatif que sur un plan qualitatif. Comme le CLTP est loin d'être un ensemble figé, les mécanismes d'homéostasie doivent au fil des ans concilier maintien de la diversité du répertoire (dépendante du pool des cellules T naïves) et efficacité accrue (dépendante du pool des cellules T mémoires) en régulant étroitement entrée et sortie au sein de chaque sous-compartiment, compte tenu de la compétition des cellules résidentes pour un nombre limité de niches de survie.

Les grands mécanismes qui gouvernent l'homéostasie ne sont pas sollicités de la même façon en situation basale, au décours d'une réponse immunitaire intense ou en situation de déplétion lymphocytaire intense. Les mécanismes homéostatiques diffèrent également selon le caractère naïf ou mémoire des cellules T, qui se traduit par une compétence fonctionnelle différente. Cette diversité fonctionnelle a aujourd'hui une traduction phénotypique, certes imparfaite, mais qui a permis de mieux appréhender les processus d'homéostasie spécifiques à chacune de ces différentes catégories de cellules T.

1.1. Caractérisation immunophénotypique des cellules T naïves et mémoires chez l'Homme

Si la définition des lymphocytes T naïfs est assez univoque dans la littérature, celle des cellules T mémoires est plus délicate. Les travaux menés ces dernières années ont fait éclater le compartiment des cellules T mémoires en plusieurs sous-populations, selon leur profil de marqueurs membranaires, leur répertoire clonotypique, leur aptitude migratoire, leur domiciliation, la cinétique d'expression, immédiate ou après un certain délai, leurs capacités fonctionnelles et la polarisation de celles-ci.

1.1.1. Les lymphocytes T naïfs

Les lymphocytes T naïfs sont des cellules T matures, qui par définition n'ont jamais rencontré leur xéno- ou allo-antigène spécifique et qui sont considérées comme quiescentes. Ces cellules circulent en permanence au sein du compartiment lymphoïde périphérique entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires dans l'attente de leur stimulation antigénique spécifique par contact avec les cellules présentatrices que sont les cellules dendritiques matures. Chez un adulte sain, on estime qu'il existe en moyenne de cent à quatre cent millions de clones naïfs différant par les réarrangements de leur TCR $\alpha\beta$, la taille moyenne d'un clone individuel étant de l'ordre de 200 à 1000 cellules [1, 2].

La caractérisation phénotypique des lymphocytes T naïfs s'est affinée ces dix dernières années. Les isoformes de haut et de bas poids moléculaire de la tyrosine-phosphatase pan-leucocytaire CD45 (CD45RA/CD45RO chez l'Homme) ont été les premiers marqueurs membranaires utilisés pour différencier les lymphocytes T naïfs des lymphocytes T effecteurs et/ou mémoires. En effet, l'activation lymphocytaire déclenche une commutation de l'isoforme CD45RA à l'isoforme CD45RO qui survient après la première mitose, signant le passage d'un phénotype naïf à un phénotype « éduqué » qui ne présage pas de leur destinée ultérieure comme cellules effectrices ou cellules mémoires. Cependant en 1999, la possibilité d'une commutation rétrograde du CD45RO en CD45RA a été mise en évidence sur les populations T mémoires en phase de différenciation terminale, remettant ainsi en question l'interprétation de résultats acquis sur la seule caractérisation des cellules T naïves par le marqueur CD45RA [3]. Cette commutation rétrograde, initialement repérée sur la population T CD8⁺, concerne à un moindre degré la population T CD4⁺, où le contingent de cellules T CD4⁺CD45RA⁺ au stade terminal de différenciation est beaucoup plus réduit.

Il est donc nécessaire d'associer au marqueur CD45RA ou CD45RO d'autres marqueurs membranaires, parmi lesquels figurent des récepteurs de domiciliation lymphoïde et des récepteurs de costimulation [4, 5]

Le trafic régulier des lymphocytes T du compartiment circulant vers les organes lymphoïdes secondaires est essentiel pour permettre l'initiation rapide d'une réponse immunitaire primaire, y compris l'induction des réponses aux alloantigènes [6]. Gages de leur capacité de domiciliation itérative dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T naïfs expriment la molécule CD62L, ou sélectine leucocytaire (molécule d'adhérence aux glycanes des cellules endothéliales cuboïdes) et le récepteur CCR7 des chimiokines constitutionnelles, CCL19 et CCL21, molécules présentes abondamment dans les organes lymphoïdes secondaires et essentielles à la migration trans-endothéliale des cellules T naïves vers le cortex profond du ganglion.

En ce qui concerne les molécules de costimulation, elles jouent un rôle majeur dans l'étape d'acquisition de compétence des cellules T naïves, préalable à leur prolifération et leur différenciation. Ainsi, qu'ils soient CD4⁺ ou CD8⁺, les lymphocytes T naïfs expriment les récepteurs de costimulation CD28 [7] et CD27. Le récepteur CD28 a pour ligand les molécules CD80 et CD86 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène matures. Lors de la présentation antigénique, cette interaction moléculaire juxtacrine délivre le principal co-signal d'activation lymphocytaire T et potentialise l'expression membranaire de récepteurs de haute affinité pour l'interleukine (IL)-2, indispensable à l'expansion clonale. L'engagement de la molécule CD28 joue également un rôle dans le développement de la mémoire T et d'une réponse secondaire optimale [8, 9]. La molécule CD27, membre de la famille des récepteurs au TNF (TNFR7) et interagissant avec son ligand CD70, est également une molécule de costimulation dont le rôle dans la génération des cellules mémoires semble déterminant [10].

Les travaux de Sallusto, de Callan et de Farber [7, 11] indiquent que l'association des marqueurs CD45RA et CCR7 permet une définition phénotypique satisfaisante du contingent de cellules T naïves, maintenant couramment utilisée, notamment pour caractériser les lymphocytes T CD4⁺.

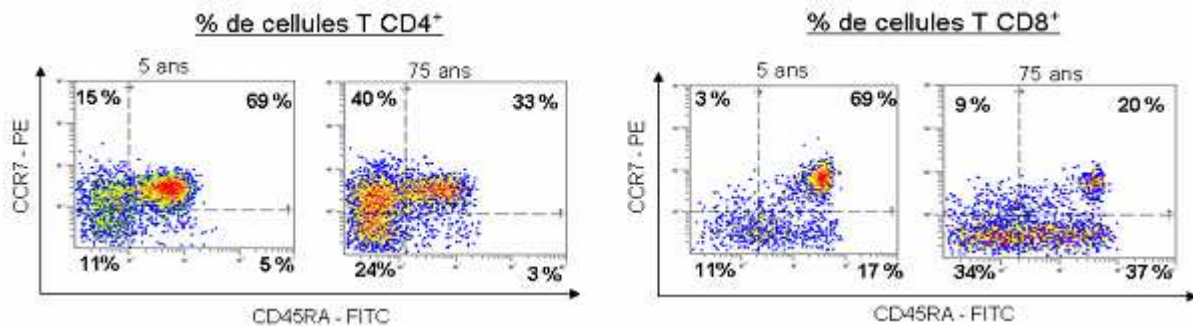


Figure 1 : *Histogrammes d'expression des marqueurs membranaires CD45RA et CCR7 par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ permettant de caractériser les cellules naïves coexprimant CD45RA et CCR7 et trois sous-populations de cellules mémoires. Les cellules de phénotype mémoire s'accumulent avec l'âge, la sous-population de différenciation terminale CD45RA⁺CCR7^{neg} s'observant surtout au sein des lymphocytes T CD8⁺ [12].*

Stimulés par leur antigène, les lymphocytes T naïfs spécifiques vont proliférer et se différencier. Au terme de la réponse primaire, la contraction clonale éliminera les effecteurs, tandis que les cellules mémoires, correspondant à environ 1% à 5% du pic d'expansion clonale, vont persister durablement (plus de trente ans après la vaccination anti-variolique) [13, 14].

1.1.2. Les lymphocytes T mémoires

La diversité clonotypique des lymphocytes mémoires est de l'ordre de moins de 1% à quelques pourcents de celle du pool des cellules naïves chez l'adulte [1, 2]. Les travaux récents permettent d'identifier au moins trois sous-populations au sein du compartiment mémoire circulant, analysé chez des sujets sains à distance de toute stimulation antigénique décelable. Ces sous-populations se distinguent non seulement par leur capacité de domiciliation lymphoïde ou tissulaire, mais aussi par leur capacité proliférative et fonctionnelle.

- *les cellules T « mémoires centrales »* (T_{CM}) n'expriment pas l'isoforme CD45RA (CD45RA^{neg}) mais expriment le récepteur CCR7 et majoritairement les molécules CD62L, CD27 et CD28. Lors d'une nouvelle sollicitation antigénique, elles possèdent une forte capacité proliférative et peuvent se diviser plus ou moins rapidement en de nombreux effecteurs secondaires dont la polarisation fonctionnelle n'est pas nécessairement figée [15]. Dans le compartiment T CD8⁺, ces cellules sont aussi capables d'exercer

des fonctions effectrices plus ou moins immédiates (sécrétion d'interféron- γ et de TNF, décharge de perforine préformée) [16-19].

- *les cellules T « mémoires effectrices »* (T_{EM}) $CD45RA^{neg} CCR7^{neg}$ et *les cellules T de « différenciation terminale »* (T_{TD}) $CD45RA^+ CCR7^{neg}$ renferment une proportion variable de cellules $CD28^{neg}$ ou $CD27^{neg}$. Elles possèdent des capacités prolifératives mais leur mission est essentiellement d'exercer des fonctions effectrices immédiates par la sécrétion rapide de cytokines et/ou de perforine et de granzymes. Elles n'expriment plus les marqueurs CCR7 et CD62L et ont donc perdu en théorie la capacité de domiciliation dans les organes lymphoïdes secondaires. Cependant, pour les cellules T_{EM} cette perte d'expression du CCR7 n'est pas absolue, car elles auraient la capacité de ré-exprimer ce marqueur en cas de re-stimulation [20, 21] ou d'utiliser des interactions avec la sélectine P pour émigrer dans les ganglions inflammatoires [22]. Ces cellules mémoires ont par contre acquis plusieurs récepteurs de chimiokines pro-inflammatoires au cours de leur différenciation ainsi que des récepteurs et intégrines de domiciliation dans le compartiment cutané ou muqueux [23, 24].

1.1.3. L'évolution naturelle des compartiments naïf et mémoire

A l'exception des âges extrêmes, le nombre de cellules T circulantes, reflet indirect mais imparfait de l'homéostasie du CLTP, reste relativement constant au cours de la vie malgré l'involution progressive du thymus, source par excellence de cellules T naïves matures, et les multiples sollicitations antigéniques qui accumulent des cellules mémoires tout au long de la vie.

La persistance des clones n'est pas synonyme d'une quiescence absolue, mais implique au contraire des divisions périodiques des cellules qui les composent en absence de stimulation antigénique exogène connue. Les études par marquage métabolique des lymphocytes T périphériques ont révélé que le compartiment naïf circulant a un taux de prolifération basale extrêmement faible et une durée de vie intermitotique de l'ordre de 4 à 12 mois pour les cellules T $CD4^+$ naïves et de 4 mois pour les cellules T $CD8^+$ naïves. Malgré la longévité de la mémoire immunitaire, la durée de demi-vie intermitotique des cellules mémoires n'est que de quelques semaines, décroissant des cellules $CD4^+ T_{CM}$ aux cellules T_{EM} et T_{TD} , avec 1 à 5% des cellules en cycle [25, 26].

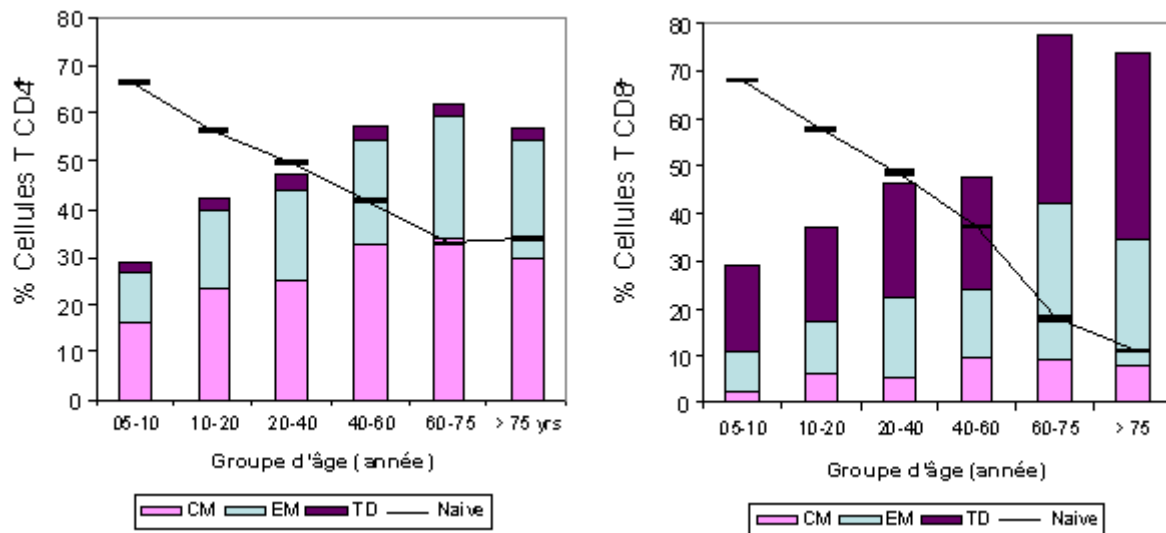


Figure 2 : Evolution des cellules T naïves et mémoires avec l'âge. Pourcentage des sous-populations mémoires T CD4⁺ ou CD8⁺ rapportés à la population CD4⁺ ou CD8⁺ totale selon les différentes tranches d'âge. La médiane du nombre de cellules T naïves est représentée par le trait noir continu [12].

Les premières études de la dynamique d'évolution des cellules T naïves et mémoires avec l'âge reposaient sur l'utilisation des marqueurs CD45RA/CD45RO, du CD28, ou encore CD95, ce qui rendait difficile une bonne caractérisation simultanée des populations T naïves et mémoires [27, 28]. L'utilisation conjointe des marqueurs CD45RA, CCR7 et CD28 montre que le pourcentage et le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (CCR7⁺CD45RA⁺) diminuent progressivement à partir de la puberté [12, 29]. Les populations T CD8⁺ naïves sont plus sensibles à ce déclin, décroissent deux fois plus rapidement que les cellules T CD4⁺ et peuvent représenter un contingent très minoritaire chez certains sujets très âgés. Le nombre des cellules T mémoires s'accroît en revanche avec l'âge, avec une accumulation préférentielle de cellules T_{CM} pour les lymphocytes CD4⁺, tandis que dans le compartiment T CD8⁺, ce sont les cellules T_{EM} et T_{TD} qui s'accroissent avec l'âge. Il existe cependant de fortes variations inter-individuelles [12, 29].

1.2. Les grandes voies de régénération du CLTP après lymphodéplétion intense

L'identification des mécanismes mis en œuvre pour permettre l'homéostasie des principales populations lymphocytaires T s'est faite en plusieurs étapes. Des approches expérimentales de reconstitution après déplétion intense du CLTP chez l'animal ont permis de caractériser les grandes voies de régénération disponibles et, notamment, de dévoiler les capacités insoupçonnées d'expansion des lymphocytes T périphériques matures. Ces données ont permis d'interpréter la reconstitution du compartiment lymphocytaire T après lymphodéplétion chez l'Homme.

1.2.1. Les trois grandes voies de régénération identifiées dans les modèles animaux

Après déplétion intense du CLTP, trois grandes voies de régénération sont différemment sollicitées selon le modèle expérimental et l'âge de l'animal. On distingue les voies de différenciation thymique et extra-thymique quiensemencent le compartiment périphérique et l'expansion périphérique de cellules T matures.

- **La régénération de cellules T par les émigrants thymiques**

L'importance du thymus dans la reconstitution d'un compartiment T déplété a été démontrée après l'irradiation subléthale de souris euthymiques ou thymectomisées qui recevaient une greffe médullaire déplétée en cellules T. Tandis que les souris thymectomisées restaient lymphopéniques après la greffe [30, 31], les souris euthymiques reconstituaient progressivement leur compartiment périphérique grâce à la génération de lymphocytes T par thymopoïèse à partir de progéniteurs médullaires. Dans ces conditions, les nouvelles cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ sont en proportion équilibrée dès le troisième mois, sont de phénotype naïf (CD45RB⁺) et ont un répertoire diversifié qui se traduit par une parfaite immunocompétence de l'animal vis-à-vis de xéno ou allo-antigènes. Cette voie conduit à la reconstruction progressive d'un système immunitaire naïf proche de celui de jeunes souris car la production thymique « aveugle » n'est pas asservie à la lymphocytose périphérique [32, 33]

- **La différenciation extra-thymique de progéniteurs médullaires**

La différenciation extra-thymique de progéniteurs d'origine médullaire occupe une place mineure pour le renouvellement des cellules T conventionnelles. Différents sites ont été décrits, principalement l'intestin, le foie, le poumon et la moelle osseuse. Les cellules T produites dans ces sites sont généralement considérées comme non circulantes et de répertoire restreint. Elles ont des caractéristiques bien particulières : il s'agit principalement de lymphocytes T à récepteur $\gamma\delta$, ou $\alpha\beta$ d'intensité intermédiaire d'expression ($\alpha\beta^{\text{int}}$) ou de diversité inférieure à celle des cellules T conventionnelles, ou encore cellules TCR $\alpha\beta^+$ CD4^{neg} CD8^{neg} [34].

- **L'expansion périphérique de lymphocytes T matures**

L'identification de cette voie de régénération repose sur des expériences de reconstitution du compartiment T périphérique de souris adultes thymectomisées ou de souris athymiques au moyen d'inoculum de cellules T périphériques. Ces cellules T se sont avérées capables de reconstituer durablement au niveau quantitatif le compartiment T périphérique des animaux receveurs. Il s'agit donc de l'expansion par prolifération homéostatique périphérique d'un pool de lymphocytes T matures, ayant déjà réarrangé les gènes codant pour leur TCR $\alpha\beta$. Les caractéristiques de cette voie de régénération ont été précisées par différents travaux :

- **La capacité de reconstitution est relativement indépendante de la taille de l'inoculum de cellules T matures.** L'utilisation d'inoculums de lymphocytes T spléniques de taille variable (5×10^3 à 1×10^7) influe sur le temps nécessaire pour la reconstitution mais, dans tous les cas, le nombre total de cellules T accumulées chez la souris receveuse se stabilise à une valeur proche de la lymphocytose T et du rapport CD4/CD8 de la souris euthymique contrôle. Des expériences de transfert en cascade montrent que le plus souvent la totalité du considérable potentiel d'expansion des cellules T matures n'est pas atteint et que le degré d'expansion des cellules T périphériques varie selon le degré de déplétion du compartiment périphérique [35].

- **La diversité du répertoire T est limitée après expansion périphérique :** un inoculum de très faible taille ou un contexte antigénique perturbé chez la souris receveuse, comme la surreprésentation d'antigènes de forte affinité, aboutit à la restauration d'un répertoire fortement biaisé, oligoclonal [36, 37].

- **La régénération s'opère avec une étape de « sélection positive » périphérique déclenchée par l'interaction entre le TCR $\alpha\beta$ et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) enchâssant un peptide.** Le phénomène d'expansion périphérique est donc piloté par les complexes CMH/peptide reconnaissables par les clones. Lorsque l'inoculum est constitué en tout ou partie de cellules T transgéniques pour un TCR donné, l'expansion ne peut se faire qu'en présence de l'antigène correspondant chez le receveur, et aboutit alors à la reconstitution d'un répertoire T très fortement biaisé, avantagant les lymphocytes transgéniques [36, 38]. Dans les expériences où les inoculums sont des populations T non transgéniques, l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ est réduite en cas d'absence d'expression ou de masquage des molécules du CMH de classe II. Il en est de même pour l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ en cas d'absence ou d'inaccessibilité des molécules du CMH de classe I [36].

- **La capacité d'expansion des cellules T matures nécessite l'intégrité du micro-environnement :** chez des souris présentant une réaction du greffon contre l'hôte (GVH), l'altération des organes lymphoïdes secondaires perturbe l'expansion des cellules T matures, sans que celles-ci présentent d'anomalies intrinsèques [39].

- **Les cellules T qui repeuplent le CLTP par un processus d'expansion périphérique se caractérisent par un phénotype de cellules éduquées/mémoires (CD45RB^{neg} CD44^{fort}),** que l'inoculum initial soit composé de cellules T mémoires (CD45RB^{fort}) ou naïves (CD45RB^{faible}) [40, 41]. Dans ces circonstances, les cellules T naïves adoptent donc un phénotype «memory-like» sans pour autant avoir rencontré un antigène étranger [42]. On pensait initialement que les lymphocytes T naïfs transférés exprimaient transitoirement un phénotype mémoire avec des propriétés fonctionnelles de lymphocytes effecteurs (synthèse d'interféron- γ et propriétés cytotoxiques pour les cellules T CD8⁺), puis retrouvaient un phénotype naïf lorsque la lymphocytose atteignait ses valeurs sensiblement normales [43], mais cette réversion d'un phénotype «memory-like» vers un phénotype naïf reste controversée. L'équipe de

Murali-Krishna a en effet montré la persistance de cellules de phénotype « memory-like » cinq mois après l'injection de cellules T CD8⁺ dans un modèle de souris receveuse irradiée [44].

- **L'homéostasie indépendante des compartiments périphériques naïf et mémoire** a été mise en évidence dans les années 90 par différentes expériences de reconstitution. Lors d'un transfert de cellules T mémoires CD44^{fort} à des receveurs athymiques, ces lymphocytes sont capables d'expansion homéostatique en l'absence de stimulation antigénique exogène. Malgré un potentiel d'expansion considérable, et en dépit de l'espace disponible dans le CLTP par l'absence des cellules T naïves endogènes, le nombre final de cellules T CD44^{fort} reste identique à celui des souris euthymiques contrôle [41]. Réciproquement, l'exportation thymique des cellules T naïves CD8⁺ CD44^{faible} assure le peuplement et le renouvellement endogène des cellules T naïves sans empiéter sur le compartiment mémoire : une souris euthymique femelle (RAG^{-/-}) incapable de réarranger les gènes du TCR, mais qui exprime un récepteur transgénique spécifique de l'antigène H-Y, et donc qui ne produit que des lymphocytes T CD8⁺ transgéniques naïfs, génère malgré l'absence de compartiment mémoire le même nombre de cellules T CD8⁺ CD44^{faible} qu'une souris contrôle hétérozygote RAG^{+/-} capable de réarranger les gènes des récepteurs T.

- **L'indépendance de l'homéostasie des compartiments périphériques naïf et mémoire n'est cependant pas totale**, car des expériences plus récentes de transfert adoptif dans des modèles murins RAG^{-/-} montrent que la prolifération et la survie des cellules T naïves est influencée en présence de cellules T mémoires [45, 46] et qu'il existe également une compétition entre les clones mémoires [45].

- **Selon les capacités de thymopoïèse, il y a donc une contribution variable des différents processus de régénération du CLTP**

Chez les souris receveuses athymiques, l'expansion périphérique des cellules T matures est le processus essentiel qui aboutit à une reconstitution du CLTP avec un phénotype « mémoire ». La différenciation extra-thymique de progéniteurs médullaires occupe une place mineure et ne permet en aucun cas la restauration d'un compartiment naïf.

Lorsque le thymus est en place, le degré d'expansion périphérique des cellules T matures varie selon le statut du thymus de l'hôte : lorsque la régénération thymo-dépendante est effective, elle exerce une régulation négative sur le processus d'expansion périphérique, qui occupe alors une place moindre. A l'inverse, le processus d'expansion périphérique prend toute son importance chez les receveurs âgés chez qui la fonction thymique est détériorée, et permet alors de maintenir le CLTP à environ 75% de la taille normale.

1.2.2. Les grandes voies de régénération du CLPT chez l'Homme

Il y a encore une dizaine d'années, peu de données étaient disponibles chez l'Homme quant à la contribution des voies thymo-dépendantes (*de novo*) et thymo-indépendantes (expansion homéostatique périphérique) dans la régénération des lymphocytes T.

Les premières données majeures ont reposé sur l'analyse des modalités de correction des lymphopénies T induites par les chimiothérapies aplasiantes ou l'irradiation corporelle et l'étude de la dynamique de reconstitution du CLTP chez les receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) [47].

Après déplétion profonde, les populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ considérées dans leur ensemble ne suivent pas la même cinétique de reconstitution. Les populations lymphocytaires T transférées avec le greffon de CSH entrent majoritairement en cycle [48]. La correction est quantitativement plus rapide pour les cellules T CD8⁺, et cette différence est responsable d'un déséquilibre au cours des premiers mois post-greffe entraînant une inversion du rapport CD4/CD8 et un répertoire biaisé, oligoclonal. Après le premier trimestre ou semestre, la cinétique de reconstitution dépend principalement de l'âge du sujet et de ses capacités de régénération par l'entremise d'un thymus fonctionnel [49-51]. Le rôle du thymus dans la reconstitution du compartiment T naïf a pu être vérifié dans le cas d'un receveur d'allogreffe de moelle qui avait été préalablement thymectomisé [52] et après greffe de CSH, déplétées de leur contenu en lymphocytes T [49, 53, 54].

Chez l'enfant, la vitesse de régénération des lymphocytes T CD4⁺ est assez rapide (environ 6 à 18 mois contre 3 à 6 mois pour les lymphocytes T CD8⁺). Les lymphocytes T CD4⁺ qui apparaissent progressivement expriment l'isoforme CD45RA et se sont relativement peu divisés en périphérie, comme en atteste leur contenu en cercles d'excisions (TREC), séquelles du réarrangement de leur récepteur durant la thymopoïèse. En effet, contrairement au processus d'expansion périphérique consécutif à la lymphopénie, les émigrants thymiques récents peuvent proliférer tout en conservant leur phénotype naïf et les capacités fonctionnelles correspondantes, avant d'entrer en quiescence. Cette expansion post-thymique sans conversion « memory-like » est néanmoins pilotée par l'engagement du TCR, donc en principe les complexes CMH-peptide du « soi », et par les cytokines homéostatiques [55, 56]. Il existe une corrélation inverse entre le nombre total de lymphocytes CD4⁺CD45RA⁺ circulants en post-greffe et l'âge du receveur, et le taux de lymphocytes CD4⁺CD45RA⁺ est significativement plus élevé à 3 mois et à 6 mois lorsqu'il existe une expansion du thymus objectivée radiologiquement (« thymic rebound ») [57, 58]. Chez l'adolescent, la cinétique de reconstitution est plus lente [57, 59].

Chez l'adulte, en revanche, on observe une correction incomplète de la lymphocytose T CD4⁺ : à 3 mois, les lymphocytes T CD4⁺ n'atteignent que 35% de leur valeur de base, avec augmentation minimale des lymphocytes T CD4⁺ de phénotype naïf (CD45RA⁺), et les cellules T CD4⁺CD45RO⁺ de type mémoire prédominent très largement à plus de 12 mois. A ce stade, le nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺ s'est normalisé, grâce à un temps de doublement inférieur à celui des lymphocytes T CD4⁺, quelque soit l'âge du patient et la taille de son thymus, mais les cellules T CD8⁺ ont un phénotype « memory-like » [60]. La normalisation des cellules T CD4⁺ phénotypiquement naïves riches en cercles d'excision (TREC) n'est obtenue qu'après une à deux années [50, 61], mais le déséquilibre persiste souvent plus longtemps, comme en attestent les études rétrospectives menées dix ans et plus après

autogreffe ou allogreffe de CSH [62-64]. Le rétablissement du profil polyclonal, reflet de la diversité des récepteurs T s'instaure dans le compartiment naïf suite à la néogénèse thymo-dépendante [50]. Les émigrants thymiques récents, quoique générés en nombre limité en raison de l'involution thymique, conservent leur capacité d'expansion sans conversion phénotypique au moins jusqu'à la sixième décennie [65].

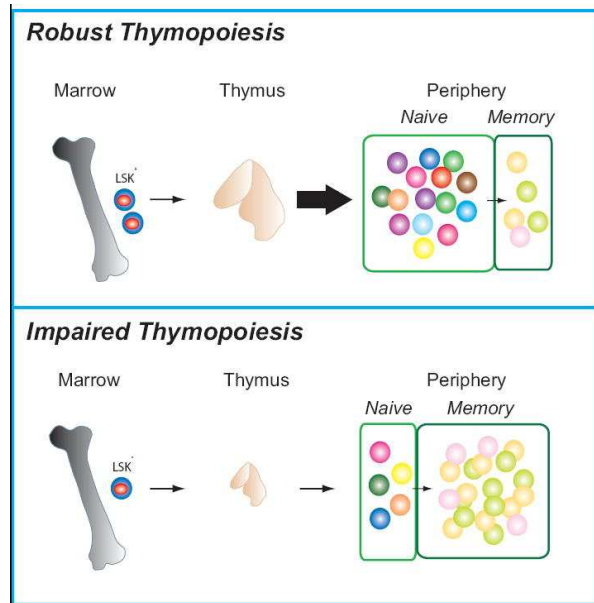


Figure 3 : *Conséquences de la fonction thymique sur le repeuplement du compartiment naïf. La diversité du répertoire est schématisée par les couleurs des cellules T [66].*

L'ensemble de ces données souligne l'importance du thymus dans la reconstitution du compartiment T naïf périphérique et la diminution de son efficacité avec l'âge. Après lymphodéplétion intense la voie thymique est la seule voie garantissant le rétablissement d'un répertoire TCR diversifié assurant l'immunité anti-infectieuse vis-à-vis de nouveaux antigènes, une réponse vaccinale et un contrôle des maladies auto-immunes [67]. Le corollaire est un repeuplement précoce du compartiment T périphérique par l'expansion homéostatique de cellules T matures, naïves et mémoires, apportées par les greffons de cellules souches non expurgés en lymphocytes T, et à laquelle participent éventuellement les cellules T ayant échappé au traitement chimio/radiothérapeutique, selon son intensité. De ce fait, le phénotype « memory like » prédomine et le répertoire initial du CLTP est de caractère restreint.

2) Le rôle des cytokines dans l'homéostasie des cellules T

La mise en évidence de l'implication de différentes cytokines dans l'homéostasie des lymphocytes T découle de l'observation initiale de leurs effets sur la survie cellulaire grâce à leurs capacités à bloquer, *in vitro*, l'apoptose de ces cellules. Si plusieurs cytokines exercent cette activité, ce sont l'IL-7 et l'IL-15 qui

jouent un rôle majeur dans la survie des cellules T naïves et/ou mémoires et méritent, à ce titre, la qualification de cytokines homéostatiques.

Les cytokines agissent comme messagers entre les cellules par l'entremise de récepteurs spécifiques portés par les cellules cibles. Leurs effets sont généralement pléiotropes et partiellement redondants. L'IL-7 et l'IL-15 appartiennent à la famille des cytokines de type I (ou hématopoïétines). Ces cytokines n'ont souvent pas d'homologie de séquence primaire évidente (en moyenne moins de 20%), mais une structure tertiaire commune avec quatre hélices α anti-parallèles deux à deux. Les récepteurs de cytokines de type I possèdent, quant à eux, un domaine extracellulaire conservé de 200 acides aminés environ, contenant deux paires de cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfure intramoléculaires, ainsi qu'un motif consensus (WSXWS) proche de la région transmembranaire. Cet ectodomaine est appelé domaine de liaison aux cytokines ou « CBD » pour « Cytokine Binding Domain ».

Au sein des hématopoïétines, l'IL-7 et l'IL-15 appartiennent à une famille de cytokines dont le récepteur hétérodi-ou trimérique partage une même chaîne, appelée chaîne γ_c commune ou γ_c (CD132). Cette famille, qui regroupe l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, joue un rôle crucial dans le développement, la prolifération, la survie et la différenciation de multiples cellules du système immunitaire. Ces cytokines se combinent à leur complexe récepteur avec des degrés variables d'affinité, en fonction des chaînes réceptrices présentes, la spécificité d'interaction étant assurée par une chaîne α spécifique. Si les cytokines de cette famille partagent certaines fonctions, elles se singularisent aussi par des effets spécifiques sur des cibles cellulaires bien définies.

La chaîne γ_c comporte une portion extra-cellulaire de 233 aminoacides incluant deux domaines fibronectine de type III angulés en tandem, un passage transmembranaire hydrophobe et une queue cytoplasmique de 86 aminoacides. Les sites de contact plats et rigides avec les cytokines sont partiellement chevauchants, et le pont disulfure supplémentaire du 2^e ectodomaine pourrait contribuer au caractère dégénéré de l'interaction avec six ligands.

Les récepteurs comportant une sous-unité γ_c n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque et génèrent leur signal par une voie principale, la voie JAK-STAT (Janus kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription). En effet, les domaines intracellulaires des sous-unités responsables de l'initiation de la signalisation sont associés de manière constitutive à des protéine-tyrosine kinases de la famille Janus. La fixation de la cytokine au complexe récepteur induit l'hétérodi- ou trimérisation des sous-unités réceptrices, avec en conséquence la phosphorylation des Janus kinases. Les kinases JAKs ainsi activées phosphorylent les tyrosines des motifs cytoplasmiques des sous-unités réceptrices. Ces phosphotyrosines sont des sites d'ancrage pour les transducteurs STATs, ce qui conduit à leur phosphorylation par les kinases JAKs. Les STATs phosphorylés se dissocient, se dimérisent, puis se transloquent dans le noyau où ils se lient au promoteur de leurs gènes cibles.

La nature des Janus kinases et des transducteurs STATs et le recrutement des autres cascades transductionnelles déterminent la spécificité de réponse aux interleukines. Parmi les transducteurs STATs, STAT5 est impliqué dans la transduction du signal de chacune des cytokines de la famille γ_c . En

complément des effets qu'il exerce dans le noyau, STAT5 peut également activer deux voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, les voies Ras-Raf-MAP-kinases et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) [68].

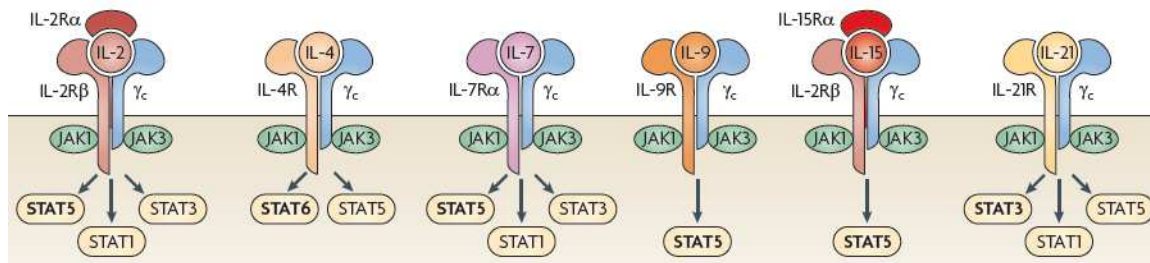


Figure 4 : Les récepteurs de la famille des cytokines à chaîne γ_c [69]

L'importance biologique de la chaîne γ_c est illustrée par les conséquences des mutations de γ_c ou de sa tyrosine kinase associée, JAK-3, tous deux responsables de déficits immunitaires combinés sévères (DICS), liés respectivement à l'X (*IL2RG*) ou autosomique (*JAK3*), avec absence de cellules T et NK, mais cellules B présentes [70, 71]. Le déficit engendré est beaucoup plus sévère que celui causé par la seule absence d'IL-2 qui permet de préserver un développement T et NK normal. C'est cette observation qui avait conduit à l'hypothèse, depuis confirmée, du caractère partagé par plusieurs récepteurs de la chaîne γ_c .

Si la chaîne γ_c représente le dénominateur commun des récepteurs à chaîne γ_c , d'autres chaînes sont partagées par les récepteurs des interleukines homéostatiques. Ainsi, l'IL-2 et l'IL-15 partagent deux de leurs trois sous-unités réceptrices : en plus de la chaîne γ -commune, elles ont en commun la chaîne IL-2/15R β ou CD122, tandis que la chaîne IL-2R α (CD25) ou la chaîne IL-15R α assure la spécificité de liaison au ligand et, s'agissant de l'IL-2, le gain d'affinité. Il peut donc y avoir une compétition pour la constitution d'un récepteur à une cytokine donnée.

La chaîne IL-7R α spécifique de l'IL-7 peut former un complexe soit avec la chaîne γ_c , soit avec le récepteur (TSLPR) de la lymphopoiétine stromale thymique (TSLP) si ces deux chaînes sont disponibles à la surface de la cellule. C'est notamment le cas des cellules dendritiques [72].

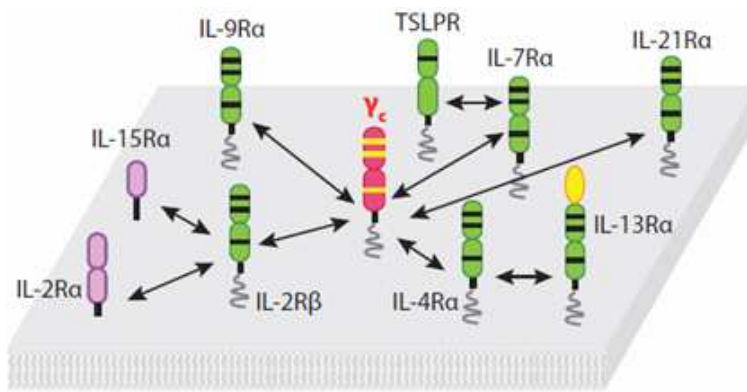


Figure 5 : Diversité des interactions des chaînes partagées des récepteurs de la famille des cytokines à chaîne γ_c [73]

2.1. L'interleukine-7 (IL-7)

L'IL-7 est une cytokine non redondante, décrite en 1988 comme une glycoprotéine de 25 kDa produite par une lignée murine issue du stroma médullaire, capable de permettre le développement de lignées pré-B mises en culture [74]. Son récepteur fonctionnel associe la chaîne commune γ_c à la chaîne IL-7R α (ou CD127) [75]. La chaîne γ_c intervient principalement dans la transduction, tandis que la chaîne IL-7R α confère la spécificité pour le ligand [76]. L'IL-7 exerce un rôle indispensable dans la thymopoïèse et le maintien des populations lymphocytaires T périphériques, comme le révèle le déficit génétique en IL-7R [77] et les modèles d'inactivation du gène de l'IL-7 ou de la chaîne IL-7R α [78].

2.1.1. Structure et production de l'IL-7

Chez l'Homme, le gène de l'IL-7 est localisé sur le chromosome 8 (8q12-13) [79]. Goodwin *et al.* ont isolé l'ADN complémentaire de l'IL-7 humaine [80] qui comporte 6 exons codant pour une séquence signal de 25 résidus et une protéine mature de 152 acides aminés. Le variant IL-7 δ 4 (sans exon 4) est retrouvé dans de nombreux tissus où son message est abondant, mais il n'a pas d'activité biologique identifiée. Le variant IL-7 δ 5 serait un superagoniste pour les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [81].

L'IL-7 adopte la conformation typique de la superfamille des cytokines de type I, formant un faisceau de quatre hélices, A et B orientées dans un sens, C et D dans l'autre, stabilisé par trois ponts disulfure. La torsion de l'hélice A est propre à l'IL-7 et stabilisera son interaction avec la chaîne IL-7R α . Les hélices A et D vont interagir avec la chaîne γ_c ; l'orientation particulière de l'hélice D conduira la chaîne γ_c à adopter une conformation particulière, avec une angulation plus aiguë de ses domaines D1 et D2, ce qui pourrait expliquer les particularités de la cascade transductionnelle de l'IL-7 comparée à celle de l'IL-2 ou l'IL-4 [82]. Les glycanes n'interviennent pas dans l'interaction avec le récepteur.

L'IL-7 est exprimée dans la plupart des organes, même le cerveau [83]. Contrairement aux autres membres des cytokines à chaîne γ_c , mais comme la TSLP et l'IL-15, l'IL-7 n'est pas produite par les lymphocytes. S'agissant de ses fonctions non redondantes dans le contrôle de la génération et du maintien des lymphocytes T, l'IL-7 est disponible dans les trois compartiments : organes lymphoïdes centraux, les organes lymphoïdes secondaires et les tissus ou organes périphériques, donc disponible au contact des thymocytes, des lymphocytes T naïfs et mémoires du compartiment périphérique et des lymphocytes T mémoires domiciliés sous le revêtement cutanéomuqueux. L'IL-7 s'adsorbe sur les composants de la matrice extracellulaire (glycosaminoglycanes, héparane sulfate, fibronectine), ce qui assure sa biodisponibilité [84].

Au niveau du thymus, l'IL-7 est produite par les cellules épithéliales thymiques et exerce un rôle crucial dans la thymopoïèse.

Au niveau médullaire, sa production par les cellules stromales assure le maintien des lymphocytes T_{CM} qui vont se domicilier dans la moelle osseuse [85]. Dans le cortex des organes lymphoïdes secondaires, l'IL-7 est particulièrement présente grâce à sa production par les cellules folliculaires dendritiques et les cellules réticulaires fibroblastiques, ces dernières produisant également les chimiokines lymphoïdes CCL19 et CCL21, ce qui leur permet d'attirer les cellules T $CCR7^+$ (naïves et mémoires centrales) tout en leur apportant des signaux de survie [86, 87].

Dans les tissus périphériques, la production de l'IL-7 est assurée par les hépatocytes, les cellules épithéliales de l'intestin, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les cellules musculaires lisses [88-91]. Les cellules dendritiques et les macrophages produisent également de l'IL-7 mais en quantités moindres [92, 93], ce qui ne les empêche pas de jouer un rôle actif dans l'homéostasie des lymphocytes T.

La production d'IL-7 était considérée comme constitutive, mais des travaux récents ont permis de mettre en évidence un contrôle direct par une simple boucle de rétro-contrôle médiée par le récepteur à IL-7 [94]. Dans les conditions basales, l'utilisation de l'IL-7 par le pool des cellules T maintient l'IL-7 à des taux stables malgré sa production continue, et l'IL-7 est parfaitement détectable dans le sérum de sujets sains [95-97]. Le TGF- β et l'IL-7 ont des effets antagonistes réciproques sur leur production [98, 99].

2.1.2. Structure et expression cellulaire de la sous-unité α du récepteur à IL 7 (IL-7R α)

Le gène *IL-7RA* est localisé sur le chromosome 5p13 [100]. Il comporte 8 exons. L'épissage alternatif conservant ou non l'exon 6 donne naissance à la forme membranaire ou la forme soluble [101] qui agit comme un inhibiteur compétitif de l'IL-7 vis-à-vis du récepteur. De nombreux polymorphismes ont été identifiés et seront décrits ci-dessous ; l'un d'entre eux (rs6897932, T244I) affecte l'épissage alternatif des formes membranaire et soluble de la protéine [102]. Cette dernière peut résulter d'épissages

éliminant l'exon 6 seul ou avec l'exon 5 [103]. La proportion relative des formes membranaire et soluble produites affecte particulièrement la réponse des cellules dendritiques à la TSLP, car celles-ci expriment fortement la chaîne réceptrice TSLPR partenaire de l'IL-7R α membranaire [104].

L'ectodomaine de l'IL-7R α comporte 219 aminoacides et adopte l'architecture en «L» caractéristique de la superfamille des récepteurs à cytokine de classe I. Ses deux domaines fibronectine de type III (FNIII) sont connectés par une forte angulation hélicoïdale (75°) où viendra se positionner l'IL-7. Les hélices A et C de la cytokine entrent en contact avec les boucles connectant les domaines FNIII de l'IL-7R α . Le domaine D1 est stabilisé par un pont disulfure comme les autres membres de la superfamille, complété par deux ponts disulfures particuliers. Le domaine D2 renferme le motif WSXWS dont les aminoacides nouent des liaisons cationiques avec les résidus voisins. Comparée aux autres complexes cytokines/récepteurs de la famille γ_c , l'interface IL-7/IL-7R α est plus limitée (705 Å²) et moins polaire (43% d'interactions apolaires), n'impliquant que 5 ponts hydrogène avec prédominance de contacts hydrophobes ou de van der Waals. Une autre particularité est le rôle indirect des glycanes qui permettent d'augmenter la vitesse d'association de l'IL-7R α à son ligand [82].

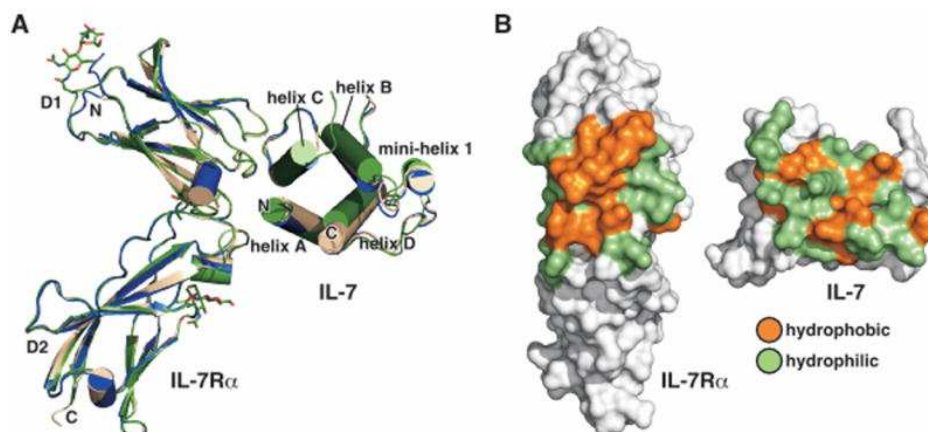


Figure 6 : Interaction de l'IL-7R α et de l'IL-7. (A) Comparaison des complexes glycosylés (représentés en vert) ou non glycosylés (représentés en bleu et brun). (B) Représentation des surfaces d'interface avec leurs aminoacides hydrophiles (en orange) and hydrophobes (en vert) [82].

Comme pour toute cytokine, les effets qu'exerce l'IL-7 sur ses différentes cibles cellulaires résultent des signaux consécutifs à l'engagement de son récepteur. La modulation de l'expression membranaire de ce récepteur mais aussi la disponibilité et l'accessibilité des cellules T à l'IL-7 assurent conjointement une régulation très fine de l'homéostasie des cellules T. Etant donné le caractère ubiquitaire de la chaîne γ_c sur les lymphocytes et la plupart des cellules hématopoïétiques, la réponse à l'IL-7 est largement contrôlée par la présence et la dynamique d'expression de la chaîne IL-7R α .

La chaîne IL-7R α (ou CD127) est exprimée quasi-exclusivement par les cellules lymphoïdes. On retrouve des cellules CD127⁺ au sein des précurseurs des lymphocytes B (jusqu'au stade pré-BII) et des précurseurs T (jusqu'au stade DN3-4) dans le thymus. Dans le compartiment périphérique, les cellules B matures n'expriment pas l'IL-7R α [92]. L'IL-7R α est fortement exprimé sur la plupart des cellules T matures, à l'exclusion des cellules T effectrices et des cellules T mémoires au stade terminal de différenciation [92] (Figure 7). Un faible contingent de cellules T CD8⁺ naïves sans CD127 a néanmoins été identifié [105]. En ce qui concerne les cellules T régulatrices naturelles, elles ont pour caractéristique générale une faible expression du CD127 [106]. On retrouve également un certain degré d'expression d'IL-7R α sur les monocytes et les cellules dendritiques [91], mais celles-ci expriment beaucoup plus la chaîne TLSPR [72, 107]. Les cellules du stroma médullaire expriment également l'IL-7R α [108].

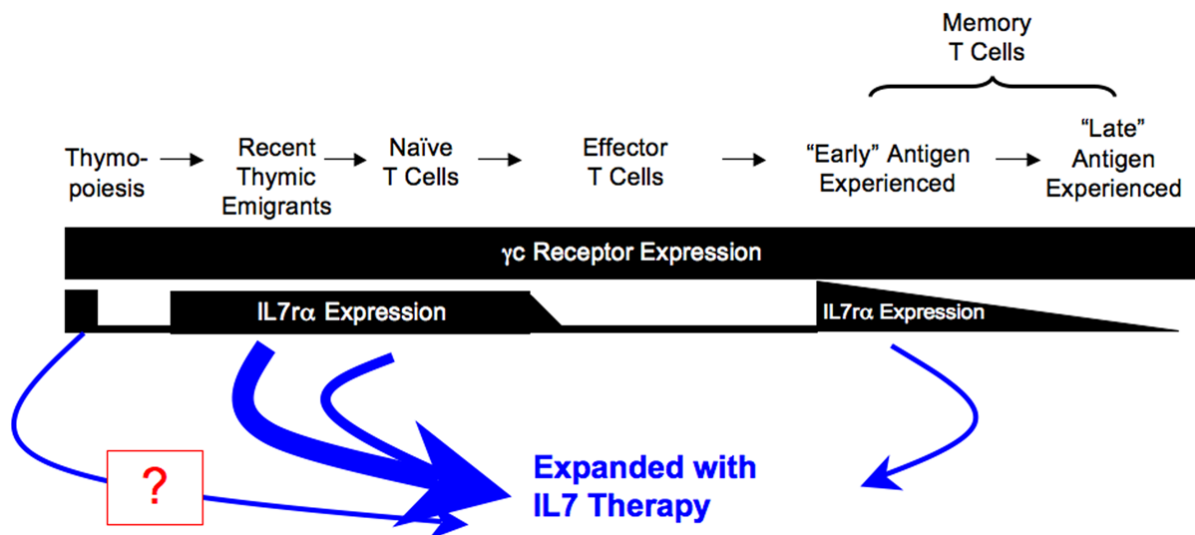


Figure 7 : Expression de la chaîne IL-7R α et de la chaîne γ c aux différentes étapes de la différenciation des thymocytes et au niveau des sous-populations lymphocytaires T périphériques [109].

2.1.3. Voies de signalisation du récepteur hétérodimérique engageant l'IL-7

La signalisation déclenchée par l'engagement du récepteur passe par l'activation des kinases JAK1 (grâce à la « boîte 1 » cytoplasmique de l'IL-7R α et JAK3 (après formation du complexe ternaire IL-7/IL-7R α / γ c), qui catalysent la phosphorylation des protéines STAT5A et STAT5B et à un moindre degré STAT1 et STAT3. L'IL-7 entraîne aussi l'activation de la phosphoinositide 3-kinase et de kinases de la famille src [110, 111] et des kinases activées par les mitogènes (MAP kinases) à l'exception de la kinase ERK (alors que celle-ci est impliquée dans la réponse proliférative à l'IL-2) [112]. L'étude de souris exprimant des formes chimériques d'IL-7R α indique que la spécificité de la réponse à l'IL-7

dépend moins des particularités du domaine cytoplasmique de l'IL-7R α que de sa géométrie particulière d'interaction avec la sous-unité γ_c [113].

Cet engagement du récepteur à l'IL-7 a pour principales conséquences de modifier la capacité de survie, le métabolisme, les capacités migratoires et la régulation du cycle cellulaire [114].

- Par les voies de la PI3-kinase et des Janus kinases, l'IL-7 induit l'expression de deux facteurs anti-apoptotiques, BCL-2 (B cell lymphoma 2) et MCL1 (myeloid cell leukemia sequence 1) tandis qu'il réprime les facteurs pro-apoptotiques BID, BIM et BAD. Chez les souris déficientes en IL-7R α , la surexpression de BCL-2 ou l'inactivation de *Bim* restaurent partiellement le nombre de thymocytes et de cellules T périphériques [115-117].

- Cet effet sur la survie cellulaire est conforté au niveau des cellules T naïves par un renforcement de leur capacité métabolique grâce à l'expression accrue d'un transporteur du glucose (GLUT1) via la voie PI3-kinase/AKT [118], ainsi que la régulation transcriptionnelle de l'hexokinase II [119].

- L'IL-7 agit également sur l'homéostasie des cellules T en modulant leurs capacités de domiciliation : la voie PI3-kinase/AKT inhibe l'activité de FOXO1 (Forkhead box O1) [120] qui promeut normalement l'expression du récepteur de chimiokines CCR7 [121] et aussi celle de KLF2 (Kruppel-like factor 2), lequel induit la sélectine-L (CD62L) et le récepteur de la sphingosine 1-phosphate (S1PR1, qui contrôle la sortie des lymphocytes hors des ganglions) [122]. A cet égard, l'administration d'IL-7 recombinante au macaque entraîne un exode des lymphocytes T hors de la circulation sanguine [123]. FOXO1 agit également sur le gène *IL7RA* et contrôle à ce titre l'expression de la chaîne IL-7R α . Ce facteur de transcription contrôle donc globalement la domiciliation et la survie des cellules en réponse à l'IL-7 [121, 124].

- L'inhibition de FOXO1 pourrait également favoriser la progression dans le cycle cellulaire étant donné que ce facteur induit l'expression de l'inhibiteur d'une kinase cycline-dépendante p27 kip1 [120, 121].

- L'effet prolifératif de l'IL-7 exige une exposition plus forte à l'IL-7 que l'effet sur la survie cellulaire. Le maintien du potentiel répliatif des lymphocytes T est également préservé dans la mesure où l'IL-7 induit l'expression de la télomérase dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires [125] et les lymphocytes T CD8⁺ mémoires [126].

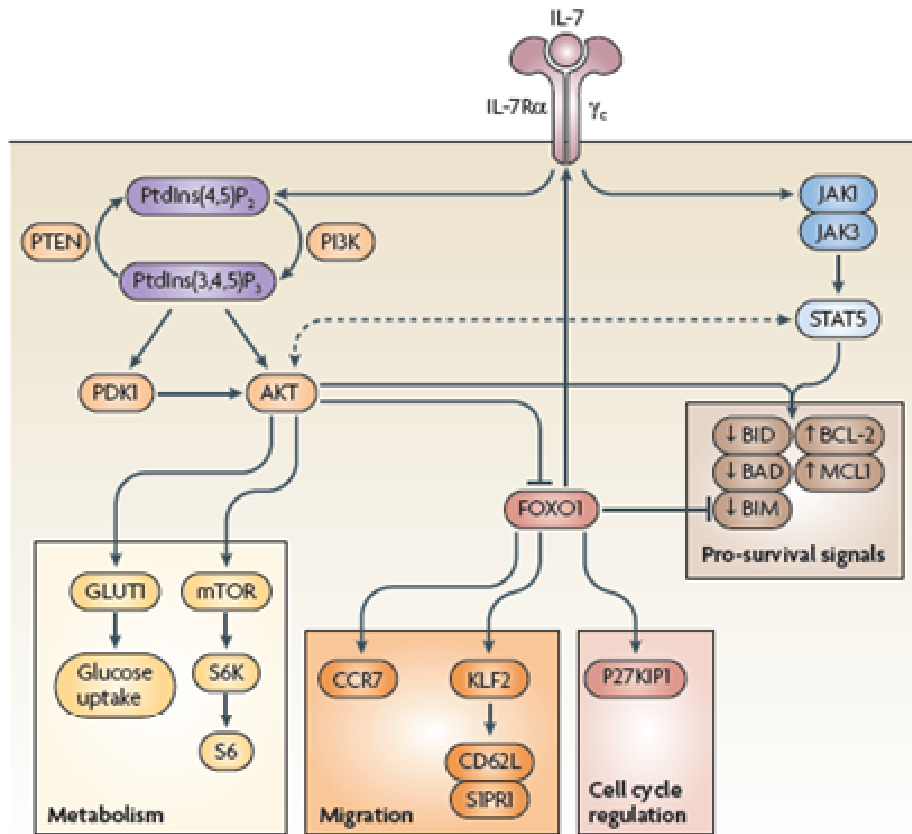


Figure 8 : Voies de signalisation activées par IL-7/IL-7R α [87]

2.1.4. Les interconnexions du récepteur et des voies de transduction modulant la fonctionnalité de l'IL-7

L'IL-7 est une cytokine vitale, non redondante. Pour autant, ses effets biologiques ne peuvent être interprétés sans considérer l'impact des autres signaux en présence, en particulier ceux résultant de l'engagement du récepteur clonotypique et/ou des autres récepteurs aux cytokines partageant la chaîne γ_c ou l'IL-7R α . Ces autres récepteurs qui exercent, comme l'IL-7, des effets sur la survie et la prolifération ont des voies de signalisation parfois très imbriquées avec celles de l'IL-7. Cette connectivité, favorisée par l'existence de chaînes réceptrices partagées, de motifs conservés communs dans les portions cytoplasmiques des chaînes réceptrices, de kinases et de transducteurs partagés et de boucles de rétro-contrôles aboutit à des effets inhibiteurs ou au contraire synergiques, selon la force et la nature des signaux en présence [111]. Ces interconnexions élargissent le champ d'action de l'IL-7 et sont déterminantes dans son action globale sur l'homéostasie des cellules T.

- **Impact du caractère partagé de chacune des deux chaînes du récepteur**

- L'IL-7R α et le TSLPR peuvent être co-exprimés par les cellules T, les cellules pré-B et les cellules dendritiques. Une compétition entre les deux ligands, l'IL-7 et le TSLP, peut donc se produire selon la

proportion des cytokines dans le microenvironnement de la cellule et, à sa surface, la disponibilité de l'IL-7R α et ses possibilités d'association à la chaîne γ_c ou au TSLPR.

Le TSLP agit sur les lymphocytes T essentiellement en modulant la fonction des cellules dendritiques [127]. A leur niveau, la compétition entre les effets de l'IL-7 et du TSLP peut influencer leur capacité à induire une différenciation Th2 des cellules T CD4⁺ qu'elles sont en train d'activer [107], contrairement aux réponses orientées vers la polarité Th1 [128] voire Th17 [129] quand l'IL-7 agit seule.

- L'IL-7R α et la chaîne γ_c ne sont pas pré-associés constitutivement à la surface des cellules T quiescentes. La formation d'un complexe récepteur fonctionnel nécessite l'association de ces deux chaînes et leur insertion dans des radeaux lipidiques membranaires riches en cholestérol et en sphingomyéline [130]. Ce processus peut être déclenché après pontage par l'IL-7 ou par l'activation des cellules T par leur antigène [131]. Dans ce cas, l'intensité du signal cognitif conditionnera la réponse des lymphocytes T CD4⁺ à l'IL-7 [132].

- L'IL-7 et l'IL-15 peuvent également être en compétition si l'expression à la membrane de la chaîne γ_c est le facteur limitant. Effectivement, une transduction préférentielle de l'IL-15 est observée lorsque la chaîne γ_c est faiblement exprimée [133].

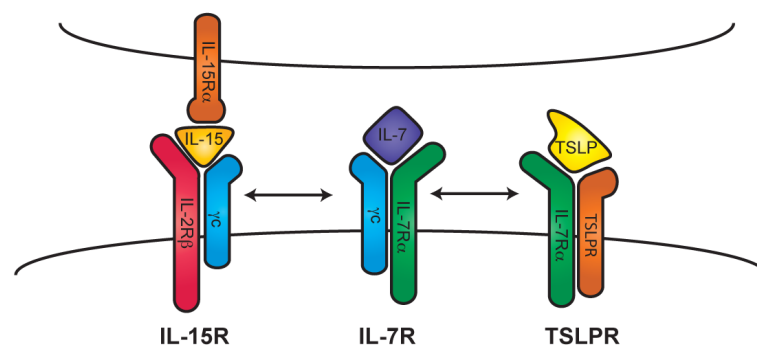


Figure 9 : Les partages de chaînes permettant la réceptivité à l'IL-7, au TSLP et à l'IL-15 et la compétition éventuelle entre ces cytokines [111].

- **Impact d'une signalisation partageant de nombreux composants**

Les récepteurs à IL-7 et à IL-15 induisent une voie de signalisation commune car la chaîne IL-7R α et la chaîne IL-2/15R β associées à la chaîne γ_c induisent la voie JAK1/JAK3/STAT5/STAT3. L'engagement simultané des récepteurs à IL-7 et à IL-15 pourrait ne pas aboutir à un effet additif en raison d'une quantité limitée de STAT5. Il apparaît cependant que l'IL-7 est plus efficace que l'IL-15 pour activer STAT5, au moins dans le cas des cellules T CD8⁺ [134]. En outre, la cinétique d'activation des transducteurs STAT3 et STAT5 diffère, car leurs domaines d'interaction SH2 (Src homology 2) entrent en compétition pour la phosphotyrosine 449 de la chaîne IL-7R α engagée par l'IL-7 [135].

- **Impact des contrôles inhibiteurs**

Les dimères de STAT5 induisent la production des protéines inhibitrices SOCS1 (Suppressor of cytokine signaling 1) qui en retour inhibent l'activation de STAT5 par la kinase Jak1 [136]. Les répresseurs de la famille SOCS sont également induits par d'autres cytokines. Dans le cas des lymphocytes T CD8⁺, le répresseur transcriptionnel Gfi1 (Growth factor independence 1) est également surexprimé en réponse à l'IL-7 et d'autres interleukines [137]. Le rôle crucial de Gfi1 a été souligné lors de l'analyse des perturbations induites dans la population T CD8⁺ par l'infection à VIH [138].

2.1.5. Régulation de l'expression de l'IL-7R α selon la biodisponibilité de l'IL-7

Quand le nombre de cellules T est normal, la régulation du degré d'expression de l'IL-7R α à la membrane d'un lymphocyte individuel impacte directement sa capacité à consommer l'IL-7, dont les concentrations physiologiques limitées instaurent une compétition entre les cellules pour l'utilisation de cette cytokine.

Comme pour d'autres interactions récepteur-ligand, la liaison de l'IL-7 à son récepteur entraîne l'internalisation et la dégradation de l'IL-7R α [139], mais en outre la signalisation induite par l'IL-7 provoque la régulation négative de la transcription du gène *IL-7RA* [137, 140]. Cet effet répressif s'oppose aux modalités de régulation adoptées par les autres cytokines de la famille γ , qui au contraire induisent l'expression de leurs propres récepteurs. La régulation négative de l'expression de l'IL-7R α par l'IL-7 elle-même est probablement un élément clé de régulation des réponses cellulaires T à cette cytokine ubiquitaire. Ainsi, les cellules T venant de recevoir un signal de survie de l'IL-7 via l'engagement de l'IL-7R α cessent de capter l'IL-7 disponible en stoppant l'expression de l'IL-7R α , ce qui autorise d'autres lymphocytes IL-7R α ⁺ à fixer l'IL-7 environnante et permet ainsi à un maximum de cellules T de survivre lorsque celles-ci sont en nombre normal et que la faible concentration physiologique d'IL-7 est limitante. Ce processus est à la base du modèle d'oscillations entre stade réceptif/réfractaire à IL-7, un modèle « altruiste » à même de préserver la diversité du répertoire au sein du CLTP [91].

L'étude comparative des effets de l'engagement du TCR $\alpha\beta$ et du récepteur CD28 d'une part, de l'exposition à l'IL-7 d'autre part, révèle que chaque événement réduit la transcription de la chaîne IL-7R α . La réexpression de l'IL-7R α est rapide (7 heures) si sa perte était due à l'IL-7, tandis que non seulement le signal cognitif exerce une action répressive cinq fois plus forte, mais surtout la réexpression éventuelle de l'IL-7R α est très tardive [141]. De même, l'IL-2 réprime l'expression de la chaîne IL-7R α [140]. Ainsi, la modulation de l'IL-7R α par l'IL-7 n'empêche pas durablement la réactivité des lymphocytes T naïfs à cette cytokine homéostatique, contrairement aux effets du signal cognitif relayé par l'IL-2. Cette différence remarquable peut rendre compte du processus de contraction clonale, qui rétablit approximativement la taille des clones sélectionnés par leur antigène, avec une exception importante : un

petit nombre de cellules activées finira par réguler positivement l'IL-7R α , ce qui leur permettrait d'être préférentiellement recrutées vers le pool des cellules T mémoires centrales [142].

La régulation négative de l'IL-7R α par son ligand pourrait également servir à limiter une prolifération cellulaire T incontrôlée lorsque les taux d'IL-7 sont en excès. En effet la répression de l'IL-7R α est plus marquée quand la concentration d'IL-7 atteint le seuil plus élevé nécessaire à lequel son effet prolifératif [143]. Des essais cliniques ont récemment montré que des taux supra-physiologiques d'IL-7 conduisaient à une diminution d'expression du CD127, limitant ainsi le degré de réponse proliférative [144]. Un polymorphisme du gène *IL-7RA* localisé dans l'exon 6 (rs6897932) induit la synthèse d'une forme soluble de la protéine. Ce variant constitue un facteur de risque génétique pour la sclérose en plaque, associé à une augmentation des taux d'IL-7R α soluble et d'IL-7 dans le liquide cébrospinal [145]. Dans ce cas, la rupture de la boucle de rétrocontrôle négative de l'expression de l'IL-7R α pourrait participer à une dérégulation de la tolérance des cellules T aux autoantigènes.

A l'inverse, d'autres stimuli peuvent augmenter l'expression de l'IL-7R α , comme les interférons de type I [146], le ligand de FLT3 [147], le TNF [148, 149] et les glucocorticoïdes [150-152]. Des éléments de réponse aux interférons, au NF- κ B et aux glucocorticoïdes sont présents dans le promoteur *IL-7Ra* [91].

Au total, la signalisation via l'IL-7R α joue un rôle central dans la biologie de l'IL-7, avec une régulation négative de l'expression du CD127 permettant une régulation fine et dynamique de l'activité biologique de l'IL-7 *in vivo*.

2.2. L'interleukine 15 (IL-15)

L'IL-15 a été mise en évidence dans le surnageant d'une lignée épithéliale de singe et d'une lignée lymphocytaire T leucémique humaine comme un facteur soluble capable d'induire la prolifération des lymphocytes T en interagissant avec une chaîne réceptrice partagée avec l'IL-2, dorénavant dénommée chaîne IL-2/15R β ou CD122, qui s'associe à la chaîne gamma commune.

Les cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules T CD8⁺ mémoires qui expriment fortement le CD122 sont les plus sensibles à l'IL-15 [153]. Comme pour l'IL-2, une chaîne spécifique, l'IL-15R α , pilote l'interaction de la cytokine et son récepteur [154].

2.2.1. Structure de l'IL-15

L'IL-15 humaine a été clonée à partir d'une lignée de cellules stromales [155]. Son gène localisé sur le chromosome 4q31 comporte 9 exons (dont 7 exons codants) avec un exon alternatif (4a) pour le peptide leader. La région régulatrice en 5' comporte des sites consensus pour la réponse aux interférons et

au NF- κ B, autorisant donc une modulation de la production de l'IL-15 selon l'environnement cytokinique des cellules ou le contexte inflammatoire.

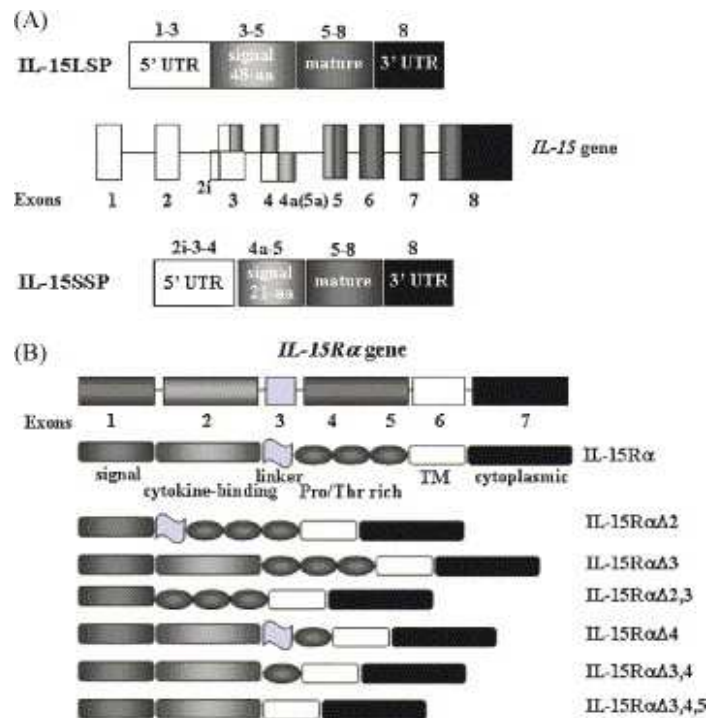


Figure 10 : Gène de l'IL-15 et isoformes d'épissage de l'IL-15. (A) Deux isoformes sont générés selon l'utilisation de l'exon 4 codant pour un peptide signal long (48 aminoacides, IL-15LSP) ou de l'exon 4a codant pour un peptide signal court (21 aminoacides, IL-15SSP). (B) Schéma du gène de l'IL-15R α et des isoformes d'épissage incluant ou excluant l'exon 2 codant pour le motif sushi de liaison à l'IL-15 [156].

Si le gène s'exprime dans de nombreux types cellulaires, parmi lesquels les fibroblastes, les monocytes, les cellules épithéliales, les mastocytes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et même les lymphocytes T ; la traduction, la maturation post-transcriptionnelle de la protéine et son exocytose sont généralement très limitées. D'une part, il existe de multiples sites AUG d'initiation de la traduction, d'autre part, l'isoforme à peptide signal court (IL-15SSP) semble exercer des effets intracrines en inhibant la transcription de l'IL-15. L'analyse de la localisation intracellulaire prédisait que seul le produit utilisant l'isoforme long (48 aminoacides) du peptide leader (IL-15LSP) s'oriente vers un cheminement d'exocytose [157], mais ces différences de routage entre isoformes peuvent être modifiées si la cellule est capable d'utiliser comme chaperon la chaîne IL-15R α [158]. On décrit également une forme membranaire de la cytokine, exprimée constitutivement à la surface des monocytes et surexprimée en réponse à l'interféron- γ [159]. Cette expression membranaire est attribuée à la longueur inusitée de la séquence signal de l'isoforme IL-15LSP ou un ancrage glycosyl-phosphatidylinositol [160].

L'IL-15 mature est une glycoprotéine de 14-15 kDa comprenant 114 acides aminés codés par les exons 5 à 8, qui malgré moins de 20% d'identité de séquence adopte la conformation générale de l'IL-2. Le faisceau à quatre hélices α est stabilisé par deux ponts disulfure, dont le pont C42-C88 homologue à celui de l'IL-2, avec une forte homologie des hélices A, C et D qui seront au contact des chaînes IL-2/15R β et γ du complexe récepteur. Les différences de taille des boucles AB, BC et CD et l'absence de l'hélice AB contribuent vraisemblablement à la spécificité de liaison de l'IL-15 à sa chaîne spécifique IL-15R α [161].

Contrairement à l'IL-2 dont la régulation est essentiellement transcriptionnelle et par stabilisation de l'ARN messager, les effets biologiques de l'IL-15 s'exercent principalement par un mécanisme original de trans-présentation impliquant la chaîne IL-15R α . Fonctionnellement, les sources principales sinon exclusives d'IL-15 sont ainsi les cellules épithéliales, les fibroblastes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques.

2.2.2. La chaîne α du récepteur à l'IL-15 (IL-15R α) et son interaction avec l'IL-15

Le gène *IL15RA* est localisé à proximité du gène *IL2RA* sur le chromosome 10p15-p14 et comprend 8 exons organisés comme ceux du gène *IL2RA*. Les ARN messagers sont produits par de nombreuses cellules parmi lesquelles les cellules stromales de la moelle, les cellules épithéliales, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T, B et NK. Seuls les isoformes d'épissage incluant l'exon 2 sont capables de se combiner à l'IL-15 [162]. L'expression de l'IL-15R α est modulable, en particulier au niveau des cellules dendritiques répondant à des signaux de danger ou aux interférons de type I ou de type II [163, 164].

L'IL-15R α présente une grande similitude structurale avec l'IL-2R α , avec une queue cytoplasmique (37 acides aminés contre 11 pour l'IL-2R α), un domaine transmembranaire, et 173 acides aminés qui projettent à la surface de la cellule une tige riche en proline et thréonine, une région charnière et un ectodomaine qui expose l'unique domaine «sushi» terminal (codé par l'exon 2) indispensable à la fixation de la cytokine [165] (alors que l'IL-2R α possède deux domaines sushi). La portion charnière adjacente codée par l'exon 3 semble concourir également à l'interaction avec le ligand [166].

Comme l'IL-2R α , l'IL-15R α a pour fonction principale de conférer la spécificité d'action de l'IL-15 lors de la formation d'un complexe quaternaire associant l'IL-2/15R β et la chaîne γ , mais sans intervenir directement dans la transduction du signal. Contrairement à l'IL-2R α , l'IL-15R α possède une très forte affinité intrinsèque pour son ligand (K_D de l'ordre de 10^{-11} M contre 10^{-8} M pour l'IL-2R α , grâce à une vitesse de dissociation beaucoup plus lente). Son affinité n'est d'ailleurs pas accrue en

présence des chaînes IL-2/15R β et γ_c , confirmant l'absence de coopérativité pour la liaison. Les topologies d'association des complexes IL-15/IL-15R α et IL-2/IL-2R α sont cependant très similaires, avec paradoxalement une surface en contact (459 Å²) plus limitée mais une meilleure complémentarité de charges électriques, d'hydrophilie et de géométrie concave/convexe entre l'IL-15 et le domaine elliptique « sushi » de l'IL-15R α [161].

2.2.3. La trans-présentation de l'IL-15

Comme l'IL-15 partageait de nombreux effets de l'IL-2 *in vitro*, et que les mêmes lymphocytes coexprimaient souvent les ARN messagers de leurs récepteurs, on a initialement considéré que l'IL-15 agissait de la même façon que l'IL-2 avec toutes les sous-unités de son récepteur portées par la cellule cible et la spécificité d'action pilotée par l'IL-15R α .

Plusieurs éléments ont suggéré un mode d'action original. *In vivo*, l'IL-15R α a une expression beaucoup plus large que celle de l'IL-2R α et qui se superpose à la transcription sinon la sécrétion de l'IL-15. Cette expression coordonnée de la chaîne IL-15R α et de son ligand rendait difficilement compréhensible l'effet de l'IL-15 très restreint aux lymphocytes T et NK, tel que déduit des modèles d'inactivation des gènes. Comme les souris IL-15^{-/-}, les souris IL-15R α ^{-/-} sont généralement en bonne santé mais ont un déficit très spécifique et de même ordre en cellules T CD8⁺ (et tout particulièrement les cellules mémoires), en cellules NK, NKT et en lymphocytes intra-épithéliaux CD8 $\alpha\alpha$, établissant que l'IL-15 et l'IL-15R α sont essentiels au développement et l'homéostasie de ces lignages cellulaires [167, 168]. Par contre, et contrairement aux effets de l'IL-2, les effets à l'IL-15 analysés par transfert adoptif ou *in vitro* n'exigent pas que le lymphocyte T CD8⁺ mémoire (CD44^{fort} IL-2/15R β ^{fort}) répondeur exprime lui-même l'IL-15R α , quoiqu'il soit dépendant de l'expression de l'IL-15R α par les cellules stromales ou dendritiques environnantes [169, 170]. Jointes à l'exigence d'une coexpression de l'IL-15R α et de l'IL-15 par ces cellules [171], ces observations inhabituelles ont conduit à envisager le concept de trans-présentation de l'IL-15 [172, 173].

L'observation d'une association intracellulaire entre l'IL-15 et l'IL-15R α , dès le réticulum endoplasmique et le complexe Golgien avant leur cheminement vers la surface de cellules dendritiques, est venue conforter ce modèle de trans-présentation qui assigne à la chaîne IL-15R α un rôle de chaperon et de transporteur de l'IL-15 vers la surface cellulaire [174] en prévenant sa dégradation [175]. Le complexe IL-15/IL-15R α , porté par la cellule productrice, peut alors stimuler les lymphocytes de voisinage, à condition qu'ils expriment les sous-unités IL-2/15R β et γ_c . L'affinité du complexe IL-15/IL-15R α est si forte que cette liaison est fonctionnellement irréversible : le complexe peut survivre à l'endocytose et se ré-exprimer ensuite à la surface de la cellule productrice [161, 173]. Le domaine cytoplasmique de la chaîne IL-15R α n'intervient pas dans la trans-présentation proprement dite, mais il permet le recyclage du complexe IL-15/IL-15R α et donc globalement sa persistance à la surface [176].

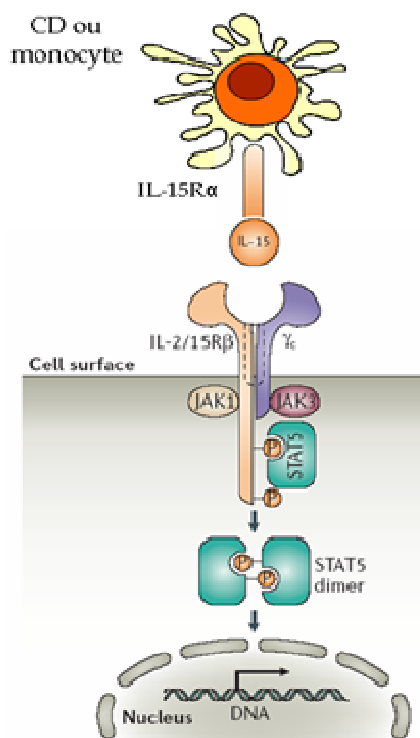


Figure 11 : Le modèle de trans-présentation : la cellule dendritique produit conjointement l'IL-15 et la chaîne IL-15R α qui s'associent avant l'exposition du complexe à la surface. Le lymphocyte cible exprime les deux sous-unités IL-2/15R β et γ_c indispensables à la transduction du signal par l'entremise des Janus-kinases [177].

Cette modalité de trans-présentation est un mécanisme unique à l'IL-15, et elle est particulièrement intéressante à considérer, étant donné que les autres composants du récepteur ne sont autres que deux chaînes partagées avec le récepteur à l'IL-2. Par rapport à une sécrétion cytokinique autocrine ou paracrine conventionnelle, pour laquelle toutes les chaînes réceptrices sont portées par la même cellule, la trans-présentation à l'avantage de permettre une distribution directe et sélective de la cytokine aux lymphocytes cibles. Les dimensions d'environ 50 Å des sous-unités IL-2/15R β et γ_c et 100–125 Å pour le complexe IL-15–IL-15R α correspondent à la distance inter-membranaire d'une synapse immunologique. Dans ce contexte, l'affinité moindre du complexe IL-2/15R β et γ_c pour l'IL-15 explique le caractère réversible de l'interaction en *trans*, toutefois suffisante pour délivrer le signal au lymphocyte [161]. Ce mécanisme de trans-présentation est actuellement considéré comme essentiel dans l'action homéostatique de l'IL-15 et le rôle qu'y assument les cellules dendritiques [178, 179]. L'étroite régulation permise par ce mode de délivrance « synaptique » permettrait d'éviter les effets délétères qu'auraient des taux très élevés d'IL-15 soluble sur les lymphocytes [180]. Une autre possibilité de présentation en *trans* serait la capture préalable de l'IL-15 soluble (sécritée) par une cellule exprimant des chaînes IL-15R α inoccupées.

Une réponse à la cytokine sous sa forme associée à la membrane plasmique est également envisagée dans le cas des monocytes/macrophages, surtout si ceux-ci sont activés [159]. Ce mode

particulier d'expression de l'IL-15LSP à la membrane pourrait expliquer les effets distinctifs des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques sur la réponse et le maintien des sous-populations lymphocytaires T CD8⁺ mémoires [181].

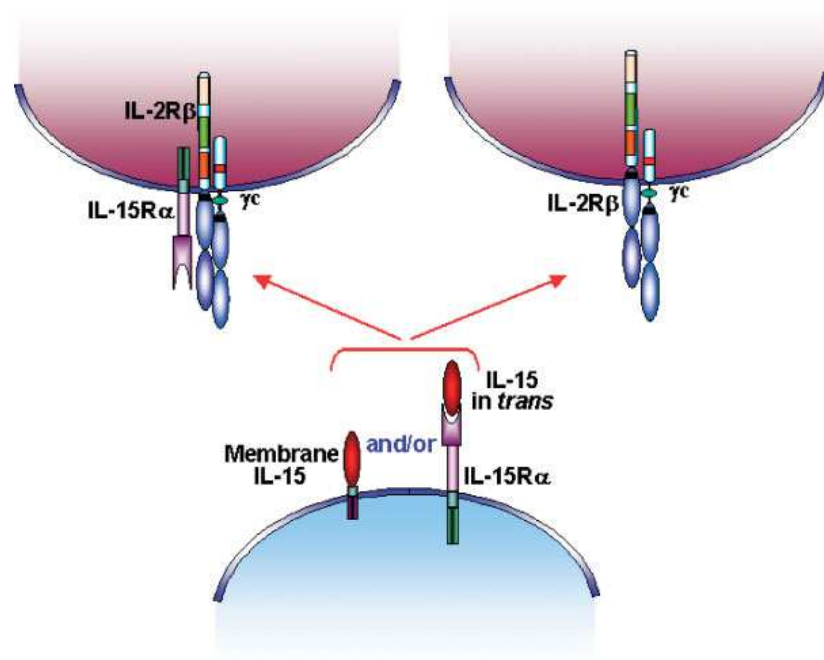


Figure 12 : Résumé des modalités d'action de l'IL-15 associée aux membranes de la cellule productrice, schématisant à gauche la forme membranaire de l'IL-15 sur le monocyte/macrophage et à droite l'IL-15 combinée à la chaîne IL-15Rα d'une cellule dendritique. Une signalisation bidirectionnelle activant le lymphocyte et la cellule productrice elle-même peut être induite, car la forme IL-15LSP de la membrane du monocyte/macrophage ou le domaine cytoplasmique relativement long de l'IL-15Rα pourraient délivrer des signaux activateurs [182].

2.2.4. La réponse à l'IL-15 soluble

D'autres modalités de réponse à l'IL-15 sécrétée, donc en mode paracrine conventionnel, restent toutefois possibles. Une première modalité est celle d'une interaction en *cis*, comme dans le cas de l'IL-2, si le lymphocyte cible exprime lui-même l'IL-15Rα. En effet, la tige riche en proline - thréonine de l'IL-15Rα et la flexibilité de la charnière permettent d'éloigner suffisamment le domaine sushi de la membrane plasmique pour lui permettre de venir « coiffer » l'IL-15 posée sur les sous-unités IL-2/15Rβ et γ_c également exprimées à la membrane du lymphocyte [183]. Cette possibilité d'interaction en *cis*, déduite de l'analyse cristallographique, vient d'être vérifiée dans le cas des lymphocytes T CD8⁺ humains [184]. Comme l'expression de la chaîne IL-15Rα est très inconstante à la surface des lymphocytes T, au moins par analyse immunocytométrique [185, 186], l'impact de ce mode d'interaction en *cis* est vraisemblablement limité.

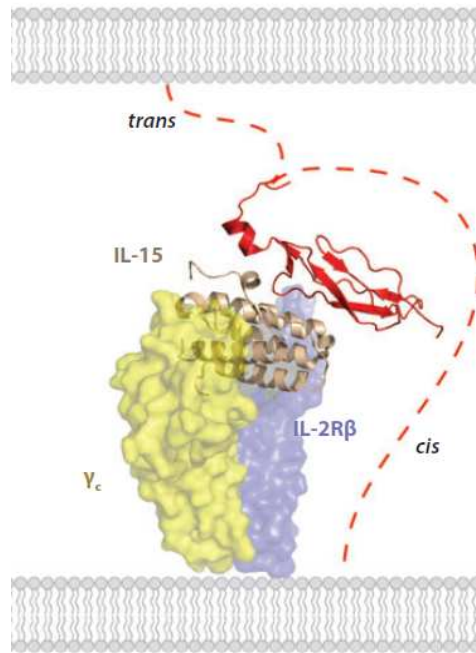


Figure 13 : Deux modalités d'interaction de l'IL-15 (modélisée en brun) selon que la cellule répondeuse (dont la membrane est figurée en bas) exprime elle-même (interaction en cis) ou non (interaction en trans) la chaîne IL-15R α (modélisée en rouge). La flexibilité de la charnière de l'IL-15R α est compatible avec ces deux modalités. Dans les deux cas, le lymphocyte cible doit exprimer conjointement les sous-unités IL-2/15R α et γ_c [73].

En l'absence d'expression de l'IL-15R α par le lymphocyte cible, l'IL-15 soluble peut se lier directement aux domaines fibronectine de type III en tandem qu'exposent chacune des sous-unités IL-2/15R β et γ_c , mais compte tenu de leur affinité modeste, une telle réponse requiert une concentration élevée (nanomolaire) de l'IL-15, et ne s'applique donc pas aux conditions basales d'homéostasie du système immunitaire [154].

L'IL-15 soluble peut également se combiner à la forme soluble de l'IL-15R α . Ces formes solubles de l'IL-15R α peuvent naître d'un processus d'épissage ou par clivage protéolytique du récepteur à la surface de la cellule productrice grâce à la métalloprotéinase à domaine disintégrine ADAM17, laquelle peut agir, que le récepteur soit ou non combiné à l'IL-15 [187, 188]. Les complexes solubles circulants exercent alors, selon la nature de l'isoforme IL-15R α impliqué, des effets agonistes ou antagonistes [166, 183].

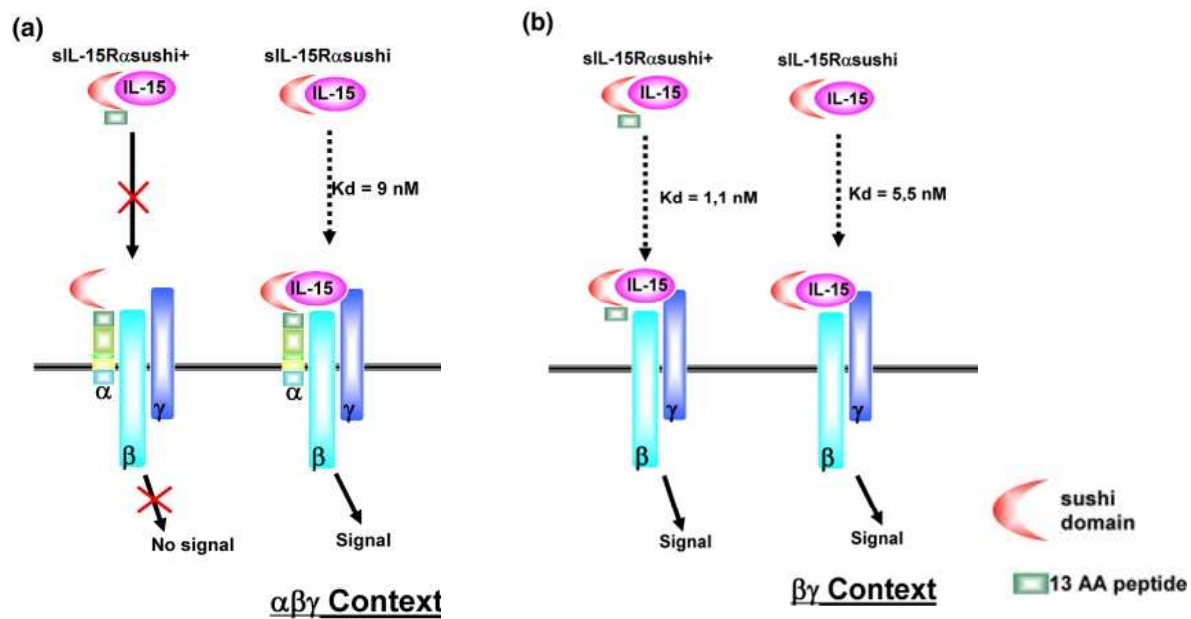


Figure 14 : *Les effets différentiels des isoformes solubles de l'IL-15Rα.* (a) Dans le contexte d'une cellule exprimant à la membrane les trois chaînes IL-15Rα, IL-2/15Rβ et γ, la fixation et la signalisation de l'IL-15 sont inhibés par les formes sIL-15Rα-sushi⁺ incluant le motif de 13 aminoacides précédant le domaine sushi, mais pas par les formes dépourvues de motif (sIL-15Rαsushi). (b) dans le contexte d'une cellule n'exprimant pas la chaîne IL-15Rα., tous les complexes sont plus efficaces que l'IL-15 soluble seule. D'après Bouchaud et al. [166].

En raison de l'importance du mécanisme de trans-présentation de l'IL-15, l'expression de l'IL-15Rα à la surface d'une cellule ne peut être corrélée à sa capacité de réponse à l'IL-15. En revanche, comme la signalisation de l'IL-15 passe par le complexe IL-2/15Rβ/γ, le niveau d'expression du CD122 est un meilleur indicateur de la capacité de réponse à l'IL-15. Les cellules T CD8⁺, et tout particulièrement les cellules T CD8⁺ mémoires, les cellules NKT et les cellules NK sont celles ayant les taux les plus élevés d'expression de la chaîne β, ce qui rend ces cellules particulièrement sensibles à l'IL-15 [189].

Le dosage de l'IL-15 circulante est également un reflet infidèle du degré d'exposition à la cytokine dans les conditions basales de l'homéostasie lymphocytaire. Par contre des taux systémiques élevés peuvent indiquer une production exagérée, notamment dans un contexte inflammatoire [190] ou un défaut de consommation en cas de lymphopénie.

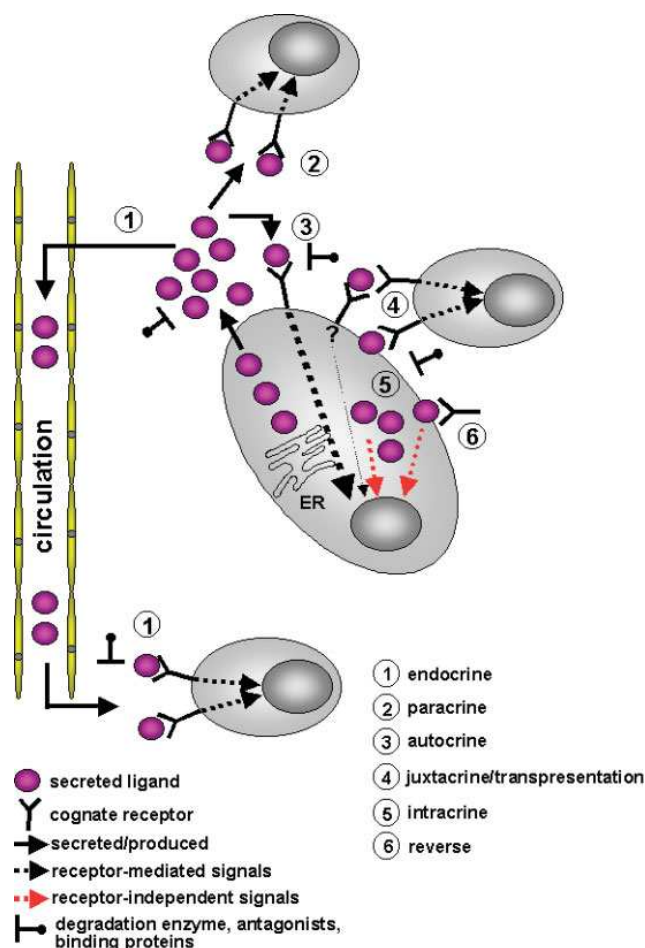


Figure 15 : Résumé des modalités d'action de l'IL-15 selon qu'elle agit associée à la cellule productrice ou à distance de celle-ci [182].

2.2.5. Signalisation par le récepteur après engagement de l'IL-15

L'IL-15 peut agir *in vitro* sur de nombreux types cellulaires, mais elle exerce ses fonctions essentielles sur les cellules T CD8⁺, les cellules NK, les cellules NKT et les lymphocytes intra-épithéliaux CD8αα de l'intestin.

L'utilisation des sous-unités IL-2/15Rβ et γ_c explique les ressemblances fonctionnelles entre IL-15 et l'IL-2 pour permettre la survie (avec induction de BCL-2) et la prolifération des lymphocytes T réceptifs. L'engagement de la sous-unité IL-2/15Rβ active la kinase JAK1 et celui de la chaîne γ_c active la kinase JAK3, entraînant la phosphorylation des transducteurs STAT3 et STAT5. Des cascades transductionnelles complémentaires sont initiées, telles que l'activation de kinases de la famille src, la voie Ras/MAP-kinase et la voie de la PI3-kinase. Au niveau des lymphocytes T réceptifs, l'IL-15 va donc permettre leur survie (avec notamment induction de BCL-2) et leur prolifération tout en minimisant l'érosion de leurs télomères grâce à l'activation de la télomérase [191].

Les cascades transductionnelles induites par l'IL-15 dépendent du type de cellule qui répond. Par exemple, dans le lignage lymphocytaire T CD8⁺, les cellules effectrices, relativement éphémères, mobilisent moins la voie PI3-kinase/AKT impliquée dans la survie que les cellules mémoires [192].

Dans le cas des monocytes, il semble qu'une signalisation inverse soit également induite par la forme membranaire de l'IL-15LSP, qui est alors phosphorylée sur ses sérines et active les kinases ERK1/2 et p38K, la GTPase Rac3 et la kinase d'adhésion focale (FAK) [156]. Ceci favorise l'adhésion et la migration des monocytes et la production d'IL-6 et de TNF. Des conséquences directes sur l'homéostasie des lymphocytes T peuvent également en découler, puisque l'IL-15 va promouvoir la différenciation des monocytes en cellules dendritiques [193].

S'agissant des cellules dendritiques, qui expriment les sous-unités IL-2/15Rβ et γ_c et surexpriment l'IL-15Rα en réponse aux signaux de danger ou aux interférons, une signalisation en *cis* impliquant l'IL-15 en mode autocrine ou paracrine contribue à leur survie et leur maturation [164]. La chaîne IL-15Rα pourrait contribuer à la signalisation [176]. Le résultat global est la surexpression des molécules du CMH de classe I, du ligand de costimulation CD86 et production d'IL-12 [163]. Cette signalisation favorise donc la réponse des lymphocytes T CD8⁺, notamment l'induction de la production d'interféron-γ et leur polarisation Tc1 [194, 195].

3) Contribution des cytokines homéostatiques au maintien ou au rétablissement de l'homéostasie des cellules T

Préserver l'homéostasie des cellules T conventionnelles, c'est parvenir à maintenir l'équilibre entre quatre populations lymphocytaires T aux propriétés fonctionnelles et de domiciliation bien différentes : les cellules T naïves, CD4⁺ et CD8⁺, et les cellules T mémoires, CD4⁺ et CD8⁺. Pour cela, deux cytokines homéostatiques principales, l'IL-7 et l'IL-15, qui vont pouvoir agir grâce à une production à l'état basal pratiquement diffuse à l'ensemble de l'organisme. Leur champ d'action, la survie et la prolifération des cellules T matures, doivent pouvoir s'exercer différemment selon l'état de réplétion du compartiment T périphérique et selon la durée de vie et l'état d'engagement dans le cycle de chaque catégorie de cellules T.

Ainsi, pour chaque cellule, les effets des cytokines homéostatiques sont directement corrélés à leur disponibilité dans le microenvironnement hébergeant la cellule T, au degré d'expression de leurs récepteurs et le cas échéant aux autres signaux en présence.

Avec bien évidemment des différences liées à leurs caractéristiques fondamentales, on peut globaliser les capacités d'action des cytokines IL-7 et IL-15 sur, d'une part les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves, et d'autre part sur les cellules T mémoires. Pour ces deux groupes cellulaires, les effets de l'IL-7 et l'IL-15 seront directement corrélés à leur concentration respective, elle-même dépendante de l'état de réplétion du CPLT mais aussi de l'état inflammatoire ou non du microenvironnement.

3.1. Le rôle de l'IL 7 dans le maintien homéostatique des cellules T naïves

A l'état basal, les cellules T naïves sont des cellules qui se doivent d'être quiescentes mais pas inertes. Elles doivent pouvoir en permanence scanner le contenu peptidique des molécules d'histocompatibilité des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, sans s'activer après la reconnaissance de peptides du « soi » vis-à-vis desquels leurs récepteurs clonotypiques ont été sélectionnés lors de leur éducation dans le thymus.

Cet état métastable leur est conféré par une exigence étroite en signaux de survie, délivrés *a minima* pour maintenir tout leur potentiel prolifératif. A leur surface, on trouve les récepteurs clonotypiques, les récepteurs de costimulation CD28, des molécules de domiciliation CCR7 et CD62L pilotant leur transfert régulier dans les organes lymphoïdes secondaires, des récepteurs pour l'IL-7 bien exprimés, mais une expression faible ou absente de la chaîne IL-2/15R β . Cette mosaïque membranaire est en parfaite adéquation avec les éléments du microenvironnement que rencontre régulièrement une cellule T naïve en dehors de toute exposition de l'organisme à un xénoantigène : des cellules dendritiques interdigitantes enchâssant dans leurs molécules du CMH un peptide du « soi » capable d'engager quelques uns de leurs récepteurs T, et de l'IL-7 sécrétée localement, mais en quantité limitée, tandis que l'IL-15 est également trans-présentée par les cellules dendritiques.

Dans les conditions physiologiques, les signaux résultant de l'engagement du TCR $\alpha\beta$ et de l'IL-7 assurent la survie prolongée des cellules T naïves, mais sont insuffisants pour déclencher leur prolifération intense [196, 197], et le phénotype membranaire reste inchangé. Aucune costimulation n'est apparemment nécessaire, puisque des cellules T CD2^{neg}, CD5^{neg}, CD28^{neg}, CTLA-4^{neg} sont capables de prolifération homéostatique [198]. Il s'agit donc bien d'une survie entretenue par ces deux types de signaux, avec auto-renouvellement par division sporadique.

Le rôle irremplaçable de l'IL-7 pour assurer le maintien du compartiment naïf est validé par de nombreux travaux expérimentaux. L'injection d'anticorps monoclonaux pour neutraliser spécifiquement l'IL-7 entraîne une lymphopénie sévère [199-202]. De même, on observe, après transfert à des animaux IL-7 déficients en IL-7, la disparition progressive des cellules T naïves, qui ne survivent que quelques semaines [203].

Les souris *IL-15*^{-/-} ont par contre des cellules T naïves, quoiqu'en nombre diminué, et les cellules T CD8⁺ naïves prolifèrent plus lentement en cas de transfert adoptif à des souris *IL-15*^{-/-} par rapport à des souris de type sauvage [167]. Ainsi, contrairement à l'IL-7, l'IL-15 n'est pas cruciale pour la survie des cellules T naïves. Comme la plupart d'entre-elles n'exprime pas ou très peu la chaîne IL-2/15R β , l'effet

modeste de l'IL-15 est sans doute indirect ou retardé, après que l'expansion ait été initiée par les signaux conjoints du TCR et de l'IL-7 pour leur permettre d'acquérir la chaîne IL-2/15R β [204].

L'absence de l'un des deux signaux de survie conduit globalement à l'apoptose des cellules T naïves, qui ont donc une double compétition à mener pour survivre [205, 206]. La compétition pour un nombre limité de ligands CMH/peptide du « soi » contribue au maintien de la diversité du répertoire des cellules T naïves [207], et la faible quantité d'IL-7 disponible à l'état basal, au regard de l'abondance des cellules T, régule étroitement la taille du compartiment, en plaçant les cellules T naïves en situation de compétition altruiste vis-à-vis de l'IL-7 [123].

La contribution relative des deux types de signaux varie selon le degré d'affinité des clones [208] et selon l'abondance des complexes CMH/peptide reconnaissables par les récepteurs T des lymphocytes qui vont proliférer [209-212]. Cette dualité permet ainsi que des taux élevés d'IL-7 puissent compenser une très faible affinité du TCR [211, 212] et, réciproquement, que les clones les plus affins persistent plus facilement que des clones moins affins [213].

Pour les mêmes raisons, le répertoire potentiel des immigrants thymiques récents quiensemencent le CLTP sera très vite réduit à ceux des clones qui parviennent à se maintenir face à leurs congénères [55], ce processus étant évidemment prédominant durant le dernier trimestre de la vie intra-utérine et les mois qui suivent la naissance [214]. De même chez l'adulte, jusqu'au moins la sixième décennie, le nombre absolu des lymphocytes T naïfs est réduit, mais la diversité de leur répertoire est préservée [65].

3.2. Modes d'action de l'IL 7 dans le contrôle de l'expansion homéostatique des cellules T naïves

Après une déplétion intense du compartiment lymphocytaire, chez la souris comme chez l'Homme, l'expansion homéostatique périphérique (également dénommée prolifération induite par la lymphopénie) joue un rôle majeur dans la reconstitution précoce du CLTP et cette voie prédomine de nombreuses années quand la fonction thymique est défailante.

3.2.1. L'effet prolifératif de l'IL-7 à concentration élevée

En cas de lymphopénie, la diminution du nombre de cellules T entraîne une diminution de la consommation de l'IL-7 et accroît de ce fait la biodisponibilité de l'IL-7. Exposées à l'IL-7 à plus forte concentration, les cellules T résiduelles consomment la cytokine et prolifèrent grâce à l'engagement conjoint de leur récepteur clonotypique. Dans ces conditions, les complexes CMH-peptides du « soi » deviennent mitogéniques, et durant leur expansion, les cellules acquièrent un phénotype analogue à celui des cellules T mémoires centrales [215].

Cette double exigence se vérifie *in vitro* chez l'Homme, puisqu'en l'absence d'engagement du récepteur TCR $\alpha\beta$, un mélange d'IL-7 et d'IL-15 s'avère inefficace pour induire la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ naïfs [186].

Au niveau des signaux délivrés, l'impact de l'IL-7 sur le facteur de transcription FOXO1 semble essentiel pour le maintien et l'expansion homéostatique des lymphocytes T naïfs [121, 124]. Les voies transductionnelles induites directement par l'IL-7 sont complétées grâce à l'engagement du TCR, qui permet l'activation de la cascade des kinases ERK, indispensable pour induire la prolifération cellulaire [73] ainsi que l'ajustement de la réponse à l'IL-7, grâce à un meilleur couplage à la PI3-kinase [132].

Des mécanismes de rétro-contrôle négatifs s'exercent pour éviter une expansion lymphocytaire incontrôlée: quand les taux plasmatiques sont élevés, la transcription du gène de l'IL-7 par les cellules stromales diminue. Ce processus est altéré chez les souris IL7R^{-/-} qui ont des taux d'IL-7 circulante augmentés d'un facteur 2 et plus de transcrits de l'IL-7 que ceux présents chez des souris RAG^{-/-}.

3.2.2. Une expansion relativement moindre des cellules T CD4⁺ naïves

De manière surprenante, cette reconstitution initiale par prolifération de cellules T matures ne rétablit pas l'équilibre entre les populations T CD4⁺ et CD8⁺ car, comparativement aux cellules T CD8⁺ naïves, les cellules T CD4⁺ naïves ont une expansion beaucoup plus limitée dans un environnement lymphopénique. Cette réponse discordante aboutit à une reconstitution immunitaire déséquilibrée, avec une inversion prolongée du rapport CD4/CD8. Les bases moléculaires et cellulaires de ce phénomène ont été récemment décortiquées et suggèrent, qu'*in vivo*, la prolifération homéostatique des cellules T CD4⁺ s'opère au sein d'une niche très spécifique, perturbée en situation de lymphopénie sévère.

La faible réponse proliférative des cellules T CD4⁺ naïves en dépit de taux élevés d'IL-7 systémique n'est pas liée à un défaut d'expression du récepteur à l'IL-7 ou de phosphorylation de STAT5, qui est comparable à celui des cellules T CD8⁺ en présence de concentrations limitées d'IL-7. Le taux d'IL-7 lui-même ne peut être considéré comme un facteur limitant cette expansion : l'injection de fortes doses d'IL-7 recombinante renforce la survie des cellules T CD4⁺ mais ne permet pas d'initier leur expansion homéostatique plus intense [144].

En revanche, les sources d'IL-7 apparaissent jouer un rôle critique dans la capacité à déclencher ou non l'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Alors que l'IL-7 est produite principalement par les cellules stromales et en moindres quantités par les cellules dendritiques, de façon surprenante, l'augmentation du nombre de cellules dendritiques (obtenue *in vivo* après traitement par le ligand de Flt3) déclenche une forte expansion homéostatique des cellules T CD4⁺ mais pas des cellules CD8⁺.

Par une série d'expériences réalisées chez des souris lymphopéniques et possédant différents chimérismes pour leurs cellules sources d'IL-7, l'équipe de Guimond et coll. [94] a déterminé l'influence de la source cellulaire productrice d'IL-7 sur la capacité d'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺ ou au contraire son blocage. Quand seules les cellules stromales produisent de l'IL-7, seules les cellules T CD8⁺ s'expandent. A l'inverse, quand les cellules d'origine médullaire (probablement les cellules dendritiques) sont seules à produire l'IL-7, les cellules T CD4⁺ prolifèrent préférentiellement. Ainsi, l'IL-7 produite par les cellules dendritiques est à la fois nécessaire et suffisante pour piloter l'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺, tandis que l'IL-7 produite par les cellules stromales entraverait cette expansion.

Pour vérifier que cette prolifération des cellules T CD4⁺ résultait bien d'une stimulation par des complexes CMH-peptide du soi en présence d'IL-7 et non pas d'une stimulation par des antigènes de l'environnement et tout particulièrement ceux de la flore intestinale, les résultats ont été validés par le transfert de cellules T CD4⁺ transgéniques pour un récepteur spécifique de l'antigène mineur de H-Y à des souris sauvages femelles. L'IL-7 d'origine stromale a un effet délétère sur l'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺, elle-même soutenue par l'IL-7 produite par les cellules dendritiques. Cet effet est aboli dans un modèle de souris receveuses chimériques dont les cellules dendritiques sont déficientes en IL-7R α ou STAT5.

Ainsi, de fortes concentrations d'IL-7 exercent un effet inhibiteur sur les cellules dendritiques, qui a pour conséquence une expression diminuée des molécules CMH de classe II mais aussi une diminution de la production d'IL-7 par ces cellules. Par cette boucle régulatrice négative déclenchée par des taux élevés d'IL-7, les cellules dendritiques auraient alors des capacités limitées de présentation d'antigène. L'interaction entre cellules dendritiques et cellules T CD4⁺ pourrait aussi être perturbée par la baisse d'expression de la molécule CD4 et de l'IL-7R α observée *in vivo* en présence de fortes concentrations de l'IL-7. Ceci est d'autant plus probable que l'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺ exige une production locale d'IL-7, par les cellules dendritiques elles-mêmes, qu'elles scannent en permanence lors de leurs passages dans les organes lymphoïdes. Les modèles murins vérifient, en effet, que l'expansion homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ a lieu dans le cortex profond des organes lymphoïdes secondaires [216].

Au total, en situation de lymphopénie sévère, l'élévation des taux d'IL-7, engendrée surtout par sa non-consommation, entraîne l'expansion homéostatique des cellules T CD8⁺ naïves et la survie des cellules T CD4⁺ naïves. Dans le même temps, cette augmentation des taux d'IL-7 bloquerait relativement l'expansion de ces dernières en agissant sur les cellules dendritiques pour diminuer leur capacité d'interaction cognitive et limiter ainsi l'expansion des cellules T CD4⁺ naïves.

3.3. Le rôle des cytokines homéostatiques dans l'homéostasie des cellules T mémoires

La durée de vie inter-mitotique des cellules T mémoires est relativement courte, leurs exigences en signaux de costimulation sont moindres et, de manière attendue, leurs exigences en signaux de survie ne sont pas exactement les mêmes que pour les cellules T naïves.

En effet, contrairement aux cellules T naïves, le signal cognitif n'apparaît pas aussi critique pour la survie des cellules T mémoires, et l'expression d'un CMH allogénique, incapable d'assurer le maintien des cellules naïves, peut suffire à préserver au moins la persistance du compartiment mémoire [217, 218]. Ce sont donc les cytokines homéostatiques qui occupent une place de choix dans l'homéostasie des cellules mémoires, avec des différences selon que l'on considère les populations T mémoires CD4⁺ ou CD8⁺, le maintien en situation basale du compartiment mémoire ou l'expansion homéostatique périphérique en situation de lymphopénie.

Dans les expériences de transfert adoptif de cellules T mémoires CD4⁺ ou CD8⁺ à des receveurs déficients en molécules de CMH de classe I ou de classe II, les cellules transférées vont persister, mais elles ne se divisent peu ou pas, suggérant que l'engagement de leur TCR pilote plus l'expansion que la survie proprement dite [218-221]. Il en est de même après ablation de leur TCR [222].

Les populations T mémoires CD4⁺ apparaissent, dans ces modèles, plus dépendantes des possibilités d'engagement de leur TCR que les populations T mémoires CD8⁺ [223]. Seddon et coll. confirment ces observations en montrant que le signal TCR n'est pas rigoureusement nécessaire au maintien du compartiment de cellules T CD4⁺ mémoires, pourvu que la capacité de production des cytokines homéostatiques soit préservée. Il confirme ainsi l'idée qu'une compensation est possible, au moins à court terme, entre les deux types de signaux [224]. En l'absence de possibilité de contact TCR/CMH/peptide chez des receveurs invalidés pour les gènes de classe II du CMH, les cellules T CD4⁺ mémoires ont cependant un profil modifié d'expression des gènes de survie et du métabolisme [223]. Dans ces mêmes conditions, les cellules T CD4⁺ mémoires ont des capacités fonctionnelles limitées en réponse à leur xénoantigène nominal injecté en même temps que des cellules présentatrices normales, CMH⁺ [225]. La disparition à terme des cellules T mémoires CD4⁺ rendues incapables de transmettre un signal via leur TCR ne peut être compensée par l'exposition à des taux élevés d'IL-7 [226]. L'absence de possibilité d'engagement du TCR par les lymphocytes T CD8⁺ mémoires conduit également à des altérations fonctionnelles, voire à long terme, à leur disparition progressive.

En situation de déplétion, la présence de xénoantigènes spécifiques peut contribuer à déclencher la prolifération des cellules T mémoires. Il s'agit tout particulièrement des antigènes de la flore intestinale non pathogènes. L'expansion homéostatique est, en effet, plus limitée si les receveurs lymphopéniques sont hébergés en conditions gnotobiotiques [227]. En l'absence de stimuli xénoantigéniques, le déclenchement de l'expansion homéostatique des cellules T mémoires est piloté conjointement par les

interactions à bas bruit du TCR avec les peptides du « soi » et les signaux des cytokines homéostatiques, qui prennent alors toute leur place [227].

En situation basale, la réponse aux cytokines homéostatiques pourrait suffire à assurer la survie des cellules T mémoires avec une prolifération à bas bruit [91, 156], mais s'avèrerait insuffisante pour permettre leur maintien à long terme, qui requiert l'engagement itératif à bas bruit du TCR, au moins dans le cas de la population CD4⁺.

3.3.1. Les cellules T CD4⁺ mémoires : rôle majeur de l'IL-7

La plupart des cellules T CD4⁺ mémoires exprime fortement la chaîne IL-7R α , autorisant l'IL-7 à exercer son rôle prédominant dans leur persistance [200, 228]. L'IL-15 peut toutefois suppléer à l'absence d'IL-7 [229]. De plus, lors d'une déplétion en cellules T CD8⁺ et NK, cellules les plus consommatrices d'IL-15, la disponibilité accrue de l'IL-15 augmente sa capacité à induire la prolifération homéostatique des cellules T CD4⁺ mémoires.

Chez l'Homme, la survie de la sous-population lymphocytaire T CD4⁺ mémoire centrale et sa résistance à l'apoptose bénéficient des effets convergents du signal cognitif et du signal IL-7, conduisant à la phosphorylation de STAT5 et FOXO3a [230].

3.3.2. Les cellules T CD8⁺ mémoires : rôle de l'IL-7 et de l'IL-15 selon l'expression ou non de la chaîne IL-2/15R β

Comparativement aux populations naïves, les populations T CD8⁺ mémoires ont une réactivité étendue aux différentes cytokines homéostatiques, notamment grâce à la chaîne IL-2/15R β qui est fortement exprimée sur les cellules T CD8⁺ mémoires les plus différenciées [189], alors que la chaîne IL-7R α reste exprimée sur la plupart des cellules mémoires CD4⁺ comme CD8⁺.

In vitro, chez l'Homme, l'exposition des lymphocytes T CD8⁺ mémoires à un mélange d'IL-7 et d'IL-15 entraîne leur prolifération, avec la perte d'expression du CCR7 par les cellules CD8⁺ T_{CM} et l'émergence progressive du phénotype de différenciation terminale [186]. L'effet de l'IL-15 sur la sous-population CD8⁺CCR7^{neg}CD122^{fort}CD127^{faible} (T_{EM} et T_{TD}) purifiée a été vérifié *in vitro*, l'IL-15 induisant leur survie et leur prolifération, notamment par l'entremise de la voie PI3-kinase/AKT [231]. Ceci n'exclut pas que les cellules T CD8⁺ mémoires puissent répondre à l'IL-15, au moins quand le taux d'IL-7 est élevé [232].

Comparées aux cellules T CD4⁺ mémoires, les cellules T CD8⁺ mémoires ont de ce fait des exigences globalement différentes, en adéquation avec leurs territoires de domiciliation. Au sein de la population T CD4⁺, les cellules mémoires centrales sont abondantes, tandis qu'au sein de la population T CD8⁺, les cellules mémoires effectrices et les effecteurs terminaux prédominent. Ces différentes sous-

populations n'occupent pas les mêmes niches, préférentiellement les organes lymphoïdes secondaires pour les cellules T_{CM}, mais aussi les tissus et organes non lymphoïdes pour les cellules T_{EM} et T_{TD}. Selon leur nature, lymphoïde ou extra-lymphoïde, ces niches délivrent aux lymphocytes qui y résident des signaux particuliers [233]. Il existe ainsi une relative concordance entre les exigences en cytokines homéostatiques des cellules mémoires, l'expression des récepteurs correspondants et l'abondance relative de ces cytokines dans l'environnement dans lequel elles évoluent. Ces différences de distribution dans l'organisme rendent le maintien des cellules T CD8⁺ mémoires globalement moins dépendant de l'intégrité des organes lymphoïdes secondaires [234].

Pour le développement et le maintien de la population mémoire T CD8⁺, fortement au contact des tissus et organes non lymphoïdes, l'IL-15, dont les sources principales sont les cellules épithéliales, les fibroblastes, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, est ainsi la cytokine de choix. Effectivement, le transfert de cellules T CD8⁺ mémoires à des receveurs IL-15^{-/-} entraîne la réduction sélective des sous-populations qui expriment fortement CD122 [153] et, réciproquement, la transgénose IL-15 entraîne la prolifération massive du contingent CD122^{fort} [180]. Le rôle de la transprésentation par l'IL-15R α est souligné par le phénotype des animaux invalidés, chez qui les cellules T CD8⁺CD122^{fort} sont quasi-absentes [167].

En situation physiologique, l'IL-7 serait davantage impliquée dans la survie que dans la prolifération basale de la population mémoire T CD8⁺, particulièrement des sous-populations qui n'expriment pas ou peu la chaîne IL-2/15R β [235, 236]. L'IL-7 peut cependant permettre l'expansion des cellules T CD8⁺CD122^{fort} : celles-ci prolifèrent chez des hôtes IL-15^{-/-} ou IL-7^{-/-}, mais non chez les receveurs invalidés pour les gènes des deux cytokines [221]. La survie des clones T CD8⁺ défectifs pour le gène *IL-7RA* est cependant compromise après transfert chez des hôtes en situation non inflammatoire, témoignant d'un effet non redondant de l'IL-7 sur la survie, au moins quand les taux d'IL-15 sont dans leurs limites physiologiques [237].

3.3.3. L'expansion prédominante des cellules T CD8⁺ mémoires

Etant principalement IL-7-dépendantes, les cellules T CD4⁺ mémoires subissent, comme leurs homologues naïfs, une entrave à leur expansion par les effets régulateurs de taux élevés d'IL-7 sur les cellules dendritiques. De plus, le contexte inflammatoire favorise la production accrue de l'IL-15 qui peut concourir à l'expansion relativement plus intense du compartiment CD8⁺ mémoire, d'autant qu'il est globalement plus réceptif à cette cytokine.

En présence de taux élevés de cytokines homéostatiques, les clones lymphocytaires T mémoires qui ont une affinité particulièrement élevée pour le complexe CMH/peptide, qu'il s'agisse de peptides du « soi », de la microflore intestinale ou de pathogènes latents, se trouvent avantagés pour s'expandre dans le CLPT. Ce mécanisme compétitif peut rendre compte du caractère oligoclonal prédominant au sein des

sous-populations memory-like les plus différenciées, CD45RA⁺ et CD28^{neg}, fréquemment observé durant la période de reconstitution immunitaire après lymphopénie [36, 238].

3.4. Les autres cytokines contribuant à l'homéostasie du CLTP

Les autres cytokines ont une contribution beaucoup plus limitée en situation physiologique, en partie parce que certaines d'entre-elles ne sont pas ou peu produites de façon constitutive, mais principalement durant les réponses immunitaires primaires ou secondaires.

L'IL-2R α est rapidement mais transitoirement augmenté après une activation des lymphocytes T et l'IL-2 contrôle leur expansion clonale, mais accroît ensuite leur susceptibilité à l'apoptose, et son rôle homéostatique est essentiellement ciblé sur les cellules T régulatrices naturelles. Cependant, l'IL-2 confère un avantage de survie aux lymphocytes qui échapperont à la contraction clonale [239]. Une forme particulière d'expansion homéostatique a également été objectivée, dans laquelle les lymphocytes T CD8⁺ murins prolifèrent sous l'action conjointe de l'élévation des taux d'IL-2 et d'IL-15 *in vivo*, à condition que les molécules du CMH soient présentes chez l'animal [240].

L'interleukine-21 (IL-21) est produite principalement par les lymphocytes T activés, les cellules NK et les cellules dendritiques. Son récepteur associe la chaîne commune γ_c et la chaîne spécifique IL-21R, laquelle est largement exprimée sur les lymphocytes T et B, les cellules NK, les cellules dendritiques, les fibroblastes et les cellules épithéliales. L'IL-21 contribue à la survie des lymphocytes T matures qui expriment l'IL-21R. Dans un modèle murin invalidé pour l'IL-21R, on observe une paradoxalement une hyperlymphocytose et une réduction de la prolifération homéostatique, ce qui suggère un effet régulateur négatif de l'IL-21 [241]. L'effet de l'IL-21 semble toutefois être dépendant du bruit de fond génétique et du contexte cytokinique. L'IL-21 seule n'augmenterait pas la prolifération cellulaire, mais agirait de manière synergique avec l'IL-15 pour potentialiser l'expansion essentiellement des lymphocytes T CD8⁺ et leur production d'IFN- γ [242]. L'association IL-21, IL-15 et IL-6 pourrait même induire la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ naïfs murins en l'absence d'engagement du TCR [243]. Chez l'Homme, l'IL-21 maintient *in vitro* la survie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs [244] et agit en synergie avec l'IL-15 sur la survie de la sous-population lymphocytaire T CD8⁺CD28⁺ [245], en accord avec l'effet reconnu de l'IL-21 pour maintenir l'expression du récepteur CD28 par les cellules T CD8⁺ [246].

La lymphopoïétine du stroma thymique (TSLP) a comme récepteur un hétérodimère utilisant la chaîne IL-7R α qu'elle associe à sa chaîne spécifique (TSLPR). Elle pourrait exercer un rôle dans l'homéostasie de la population lymphocytaire T CD4⁺, dans la mesure où les souris invalidées pour le gène *TLSPR* ont une capacité réduite de reconstitution du CLTP après irradiation subléthale, tandis que l'injection de TLSP à des souris lymphopéniques *IL2RG*^{-/-} améliore le développement des cellules T

CD4⁺ [247]. Un transgène *TLSP* permet également de corriger l'absence de développement des lymphocytes T des souris *IL7^{-/-}* [248]. Les lymphocytes T CD8⁺ murins peuvent exprimer le récepteur TSLPR et la cytokine promeut leur survie, sans toutefois agir réellement sur l'expansion homéostatique de ces cellules, peut-être parce que, contrairement à l'IL-7, la TLSP n'active pas la kinase JAK3 et active donc moins le transducteur STAT5 [249]. Chez l'Homme, un rapport récent signale l'expression de la chaîne spécifique TSLPR et un effet de potentialisation de la réponse des lymphocytes T CD4⁺ activés [250]. L'effet de la TLSP sur l'expansion homéostatique de la sous-population CD4⁺ T_{CM} serait cependant principalement indirect, par l'entremise des cellules dendritiques, beaucoup plus réactives car exprimant mieux le TSLPR [251].

L'effet des interférons sur la survie des lymphocytes T CD8⁺ est essentiellement indirect, par induction de la production et de la trans-présentation d'IL-15 via l'IL-15R α , notamment au niveau des cellules dendritiques et dans les tissus périphériques.

De même, l'effet de l'IL-12 est surtout indirect : s'agissant des lymphocytes T CD8⁺, la cytokine serait impliquée dans la modulation d'expression de la chaîne IL-7R α et la chaîne IL2/15R β [252].

Enfin, la chimiokine CCL21 contrôle l'expansion homéostatique des cellules T CD4⁺, sans doute grâce à son effet sur la domiciliation de celles-ci dans les organes lymphoïdes secondaires dans lesquels se trouvent les niches de survie pour les lymphocytes recirculants [253].

Par contre, le facteur de croissance transformant (TGF- β) exerce un effet antagoniste des cytokines homéostatiques et réprime tout particulièrement l'expansion homéostatique des cellules T CD8⁺ [254].

Quelque soit leur mode d'action, paracrine ou par contact, les cellules T régulatrices naturelles CD4⁺CD25^{fort}FOXP3⁺ peuvent exercer leur effet inhibiteur en limitant l'expansion homéostatique [255]. Toutefois, n'exprimant pas l'IL-7R α , leur expansion homéostatique éventuelle n'est pas en phase avec celle des lymphocytes T conventionnels. *In vivo* chez l'Homme, l'administration d'IL-7 recombinante entraîne en effet une diminution relative de leur représentation au sein de la population lymphocytaire T CD4⁺ [144].

3.5. En conclusion, on peut discerner deux composantes dans l'homéostasie globale du CLTP tout au long de la vie

Le rôle des cytokines homéostatiques apparaît indispensable pour assurer la survie des lymphocytes T périphériques, l'IL-7 exerçant un rôle prédominant pour la population naïve, l'IL-7 et/ou l'IL-15 contribuant plus ou moins à la survie des cellules mémoires selon leur degré de différenciation et leurs possibilités de domiciliation dans les compartiments périphériques lymphoïdes ou non lymphoïdes de l'organisme.

Le partage de la chaîne $\gamma\epsilon$ (et pour l'IL-15 de la chaîne IL-2R2/15 β) entraîne évidemment une certaine redondance des effets des autres cytokines $\gamma\epsilon$ qui peuvent donc compléter et moduler les effets des cytokines homéostatiques constitutives.

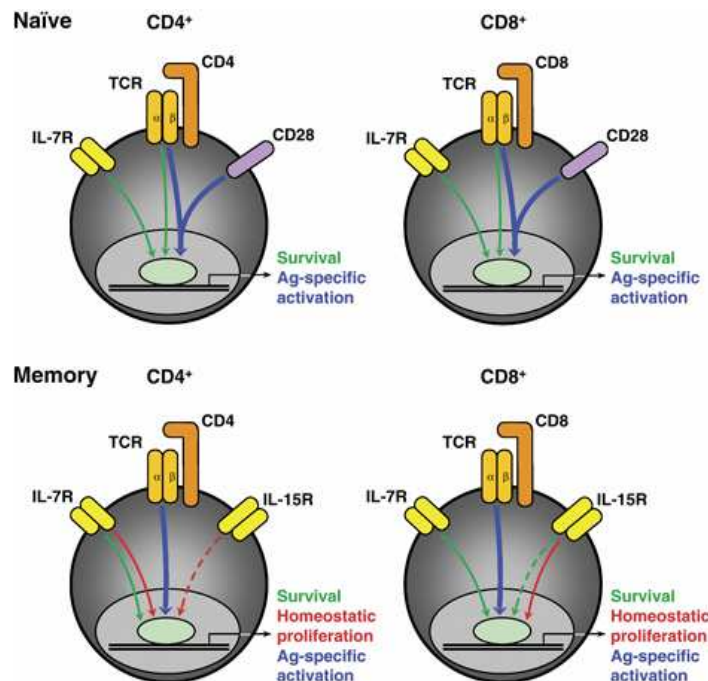


Figure 16 : Rôle des cytokines homéostatiques dans la survie et l'expansion induite par la lymphopénie, comparant les populations naïves, qui expriment la chaîne IL-7R α et les cellules mémoires, quand celles-ci ont acquis l'expression de l'IL-2/15R β (les cellules mémoires CD8⁺ T_{EM} et T_{TD} principalement) ; l'IL-15 pilote alors principalement l'expansion homéostatique de ces cellules. Dans le cas du maintien des populations activées conventionnellement par leur antigène spécifique, le rôle de l'IL-7 concerne essentiellement la survie des cellules au décours de cette étape d'activation [197].

Les cellules T naïves ont une très longue persistance intermitotique, alors que les cellules mémoires se divisent plus fréquemment, indépendamment de sollicitations xénoantigéniques décelables. Ces divisions itératives assurent l'auto-renouvellement des sous-populations naïves et mémoires. Dans ce but, l'engagement itératif du récepteur TCR $\alpha\beta$ est plus ou moins strictement requis selon les modèles expérimentaux étudiés.

Au-delà de la nature du peptide antigénique « soi » ou « non soi » et du contexte, inflammatoire ou non, qui s'y associe, l'étude comparative de l'expansion clonale induite par une stimulation immunogénique optimale et de l'expansion homéostatique induite par la lymphopénie révèle une différence notable :

- Dans le premier cas, la prolifération obéit au modèle classique dit « autopilote », pour lequel la variabilité dépend du temps mis par le lymphocyte spécifique pour franchir le seuil de compétence (transition G0/G1). Mais une fois la compétence acquise, (au moins) une mitose survient, modèle

déterministe conforme compatible avec les données dynamiques acquises grâce à l'imagerie *in vivo* des événements se déroulant dans l'organe lymphoïde qui draine l'immunogène.

- Au contraire, la prolifération des cellules naïves induite par la lymphopénie est mieux décrite par le modèle stochastique de Smith-Martin, selon lequel durant un intervalle de temps donné certaines cellules vont se diviser et d'autres non [256]. Cette variabilité d'entrée ou non en cycle pour chaque lymphocyte individuel dépend de plusieurs contraintes: l'engagement ou non de son TCR par le complexe CMH/peptide du « soi », la biodisponibilité des cytokines homéostatiques et le stade où est la cellule dans sa dynamique « altruiste » d'expression/répression du récepteur à l'IL-7 face aux autres cellules en compétition.

- Rappelons à cet égard que l'IL-7 n'agit pas de manière autocrine et que, contrairement à l'expansion homéostatique, l'IL-7 n'est pas requise pour les réponses primaires *in vivo* [235]. De plus la chaîne IL-7R α est réprimée durant la réponse primaire, qui associe la chaîne γc à d'autres récepteurs de cytokines de croissance. Enfin, l'expansion homéostatique est plus ou moins rapide chez l'animal receveur, mais en tout cas moins « explosive » que l'expansion clonale induite par un immunogène puissant.

Face à une biodisponibilité accrue des cytokines homéostatiques, les lymphocytes en situation de compétition favorable ont un avantage de survie et de prolifération sur les autres cellules, ce qui peut compromettre l'efficacité de l'immunité anti-infectieuse (primaire ou anamnestic) [257].

L'expansion induite par la lymphopénie peut aussi, en fonction de la dominance des clones et de leur avantage sur les cellules T régulatrices CD127^{neg}, favoriser l'émergence de réponses alloréactives [176, 258-260], antitumorales [261, 262] ou autoimmunes [263-265]

4) L'impact des cytokines homéostatiques après l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les mécanismes homéostatiques sont fortement sollicités après allogreffe de CSH. En effet, le conditionnement pré-greffe entraîne une déplétion intense voire totale du compartiment lymphocytaire périphérique. Le greffon non manipulé apporte des lymphocytes assurant la première étape de repeuplement du CLPT, avant la reconstitution beaucoup plus tardive d'un compartiment lymphocytaire naïf opérationnel, en fonction des capacités de thymopoïèse du receveur.

A ce titre, les allogreffes de CSH constituent chez l'Homme un modèle d'étude de la reconstitution du CLTP après lymphodéplétion. Dans le cas le plus fréquent où l'allogreffe de CSH est pratiquée pour compléter le traitement d'une hémopathie maligne, il faut tenir compte du fait que le contexte allogénique et les cellules tumorales résiduelles entraînent des particularités notables par rapport aux autogreffes.

4.1. Les lymphocytes transférés sont confrontés dans le contexte de l'allogreffe à des molécules étrangères, différentes du « soi » du donneur qui a régi la sélection négative de ses cellules T.

Si les complexes CMH/peptide « non soi » vis-à-vis desquels les lymphocytes T du donneur n'ont pas été expurgés, sont nécessaires à l'expansion homéostatiques des cellules T transférées ; ils sont aussi susceptibles d'influencer les modalités de l'expansion homéostatique elle-même. Ce rôle de pilotage de l'expansion est analogue à celui des composants de la microflore digestive révélé par comparaison des animaux lymphopéniques hébergés en conditions gnotobiotiques ou non [227]. En fonction de l'affinité propre de chaque lymphocyte T du donneur pour les complexes CMH/peptide « non soi » exposés dans le compartiment périphérique du receveur et de la biodisponibilité des cytokines homéostatiques, il pourra en découler un avantage compétitif pour certains lymphocytes issus du greffon.

L'expansion homéostatique périphérique permet aux lymphocytes greffés qui ont la spécificité adéquate d'atteindre une taille clonale suffisante pour être à même de développer une réponse alloréactive vis-à-vis de l'hôte et/ou des cellules tumorales résiduelles. S'agissant des cellules T CD4⁺ initialement naïves, l'IL-7 permet en outre de les préparer à produire de l'interféron- γ [266]. Cet effet potentialisateur de l'expansion homéostatique périphérique explique qu'une réponse alloréactive du greffon contre l'hôte aiguë puisse s'observer après une allogreffe familiale HLA-identique apportant une très faible quantité de cellules T ($1 \times 10^5/\text{kg}$) [267]

Le contexte inflammatoire péri-transplantation va créer les conditions favorables à l'expression de l'immunogénicité des alloantigènes et antigènes tumoraux, en induisant la maturation des cellules présentatrices des complexes CMH/peptide « non soi ». Le contexte inflammatoire est, de plus, susceptible de retentir sur la production des cytokines homéostatiques. C'est particulièrement le cas de l'IL-15, dans la mesure où les cellules dendritiques peuvent trans-présenter l'IL-15 et où la production de cette cytokine est augmentée par les signaux de « danger » convergeant sur la voie NF- κ B [163, 268, 269], comme précisé précédemment.

Les modèles expérimentaux ont parfois amené à considérer que les capacités fonctionnelles des cellules « memory-like » issues de l'expansion homéostatique périphérique pouvaient avoir des capacités fonctionnelles moindres que celles des « vraies » cellules mémoires restimulées par un rappel antigénique. S'agissant des cellules T CD8⁺, leur capacité fonctionnelle dépendra en fait de l'aide que leur apportent les cellules T CD4⁺ conjointement en voie d'expansion. Cette coopération réprime l'impact régulateur qu'exercerait en son absence un ligand pro-apoptotique (TRAIL, tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) sur les cellules T CD8⁺ en expansion [270]. L'effet de cette coopération a été vérifié dans un modèle murin de transplantation. L'aide délivrée par les lymphocytes T CD4⁺ permettant d'induire des lymphocytes T cytotoxiques alloréactifs parfaitement opérationnels [271].

De plus, chez 3 receveurs en rechute de leucémie myéloïde chronique après avoir reçu une allogreffe familiale dépeuplée en cellules T, l'injection de lymphocytes T CD4⁺ du donneur a permis d'obtenir une rémission cytogénétique associée à l'émergence de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques alloréactifs, au prix d'une maladie du greffon contre l'hôte chez l'un des patients [272].

Enfin, l'administration d'IL-7 recombinante chez l'Homme permet l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels, avec une expansion relativement réduite des cellules T CD4⁺ régulatrices [144, 273], ce qui peut également contribuer à promouvoir les réponses alloréactives.

Du point de vue immunologique, la réussite de l'allogreffe de CSH pour hémopathie maligne est influencée d'une part par la prise de greffe, permettant la réduction progressive du déficit d'immunité anti-infectieuse consécutif à l'aplasie éventuelle et à la lymphopénie. D'autre part, l'évolution des allogreffes est dominée par les effets bénéfiques ou néfastes de l'alloréactivité.

L'objectif thérapeutique historique était d'obtenir la reconstitution de l'hématopoïèse, abolie ou compromise par les traitements cytoréducteurs destinés à induire la rémission la plus complète possible [274]. L'objectif actuel est avant tout de réaliser une véritable immunothérapie adoptive [275], puisque les lymphocytes T apportés par le greffon sont susceptibles de permettre le développement d'une immunité anti-tumorale [276]. Cet effet de prévention de la rechute est dénommé l'effet GVL (Graft-Versus-Leukemia), Graft-Versus-Tumor ou Graft-Versus-Malignancy.

L'effet bénéfique des allogreffes de CSH peut être contrebalancé par une autre réaction immunologique, cette fois délétère, la réaction ou maladie du greffon contre l'hôte (Graft-Versus-Host Disease ou GVHD), dans laquelle l'alloréactivité des cellules immunitaires greffées est dirigée contre les tissus sains du receveur exprimant les alloantigènes [277]. La maladie du greffon contre l'hôte peut se présenter sur un mode aigu, classiquement dans les cent jours qui suivent la greffe. Sa survenue touche, à des stades de gravité différents [278], près de 40% des receveurs et sa physiopathologie est dominée par la réponse alloréactive [279]). La maladie du greffon contre l'hôte chronique survient plus tardivement. Sa physiopathologie est complexe, associant à la composante alloréactive des manifestations autoimmunes [280-286], avec une dominante plus fibrotique qu'inflammatoire. L'introduction des protocoles de conditionnement atténué a conduit à nuancer cette distinction purement chronologique en tenant compte de l'expression symptomatique et anatomopathologique, puisque des manifestations cliniques de type aigu peuvent survenir au delà du délai classique de 100 jours [287, 288].

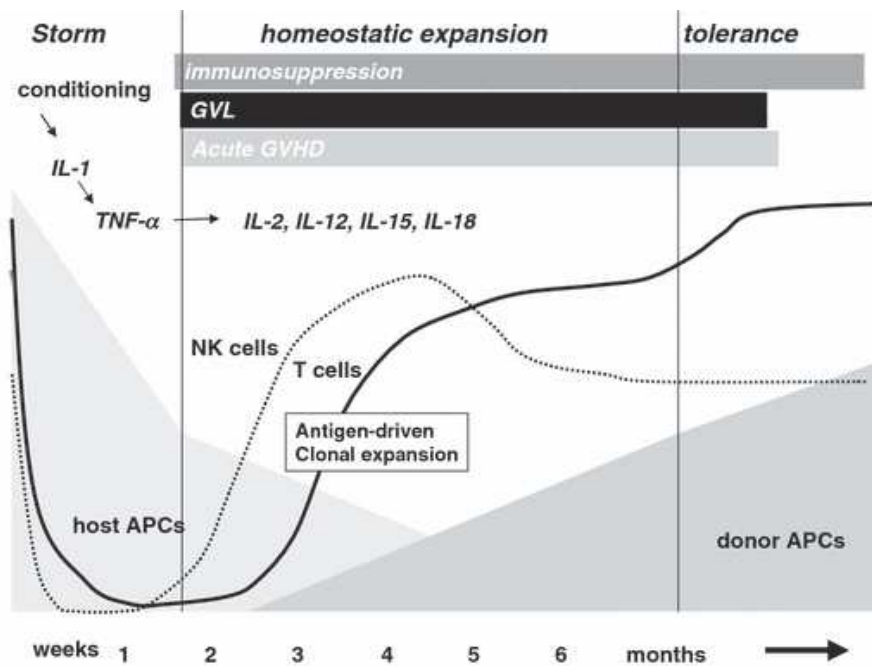


Figure 17 : Effet de l'expansion homéostatique périphérique pilotée par les alloantigènes et les antigènes tumoraux amplifiée par le contexte inflammatoire péri-transplantation durant les mois qui suivent une allogreffe de CSH. La résolution progressive de l'inflammation, si celle-ci n'est pas entretenue et amplifiée par une réaction du greffon contre l'hôte et/ou un contexte infectieux, va édulcorer cet influx de cellules dendritiques pleinement matures. Passées les premières semaines post-allogreffe, les cellules dendritiques dont la maturation est réduite seront alors tolérogènes plutôt qu'immunogènes [289].

4.2. Les populations cellulaires T impliquées dans la GVH

De nombreux travaux en immunologie fondamentale ont permis de mieux cerner la physiopathologie de la GVHD aiguë, qui est orchestrée par différents acteurs cellulaires et se déroule en 3 étapes : les dommages tissulaires, l'activation des cellules immunocompétentes du donneur et l'attaque des tissus cibles par des effecteurs cytotoxiques, principalement les lymphocytes T cytotoxiques et cellules NK [290-292]. Des données récentes ont montré le rôle crucial, quoique non exhaustif, des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels du donneur dans le déclenchement de la GVH aiguë. Plusieurs travaux montrent une corrélation entre le nombre de cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ greffées et l'incidence de la GVH aiguë chez l'homme [293-295]. Une étude prospective réalisée par notre équipe montre l'implication particulière des cellules T de phénotype CD4⁺CCR7⁺ (naïve et mémoire centrale) des greffons dans la survenue ultérieure d'une GVH aiguë. [279]. Ce rôle des cellules T naïves est confirmé par une deuxième étude clinique récente de Chang [296]. La polarisation des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ de type Th1 et Tc1 semble jouer un rôle prédominant dans le mécanisme de GVH aiguë, avec parfois des effets ambivalents de l'IFN- γ [297, 298]. Morris suggère cependant que l'alloréactivité post-greffe résulte d'un ensemble d'interactions entre le système immunitaire inné et l'immunité adaptative grâce aux cellules du greffon. Les lymphocytes T régulateurs (T reg) ont un rôle

encore discuté mais certaines études ont montré qu'une forte proportion de cellules T reg dans le greffon représente un facteur protecteur vis-à-vis de l'apparition d'une GVH aiguë [299, 300] sans incidence sur le taux de rechute. Les cellules NK et surtout les cellules NKT constituent une deuxième population ayant montré des capacités de contrôle de la GVH [301]. Toutefois, les expériences de déplétion montrent que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ allo-réactifs activés dans les organes lymphoïdes secondaires ont un rôle déterminant dans la genèse de la GVH [291].

La physiopathologie de la GVH chronique reste, quant à elle, mal comprise. Sa survenue plus tardive et les manifestations cliniques différentes de celles de la GVH aiguë laissent à penser que cette maladie répond à d'autres mécanismes et schémas d'activation lymphocytaire T et B entraînant des manifestations d'auto-immunité [280]. Récemment, la détérioration dans la fonction de sélection négative thymique a été évoquée comme mécanisme probable contribuant à la GVH chronique [282].

4.3. Les effets bénéfiques ou délétères de l'allo-réactivité

Sans sous-estimer le rôle des autres cellules impliquées dans l'immunité innée ou adaptative (cellules NK, NKT, lymphocytes T $\gamma\delta$, lymphocytes B) et les contrôles exercés par les lymphocytes T régulateurs, les cellules dendritiques myéloïdes ou plasmocytoïdes régulatrices et les cellules souches mésenchymateuses [291], les réponses lymphocytaires T contre les disparités alloantigéniques sont déterminantes pour la maladie du greffon contre l'hôte comme pour l'effet GVL. Ceci est très vite apparu grâce aux modèles animaux [302-306] et dès les premiers résultats des allogreffes déplétées en cellules T chez l'homme [307]. Très vite, il est cliniquement apparu que la maladie du greffon contre l'hôte et l'effet anti-tumoral étaient le plus souvent étroitement associés [308-310], y compris dans les protocoles plus récents utilisant après l'allogreffe des injections de lymphocytes du donneur originel [311]. Même quand d'authentiques réponses ciblées sur des antigènes propres aux cellules tumorales sont individualisables, l'allo-réactivité concomitante joue un rôle potentialisateur, comme l'indique le risque de rechute plus élevé des greffes entre jumeaux monozygotes comparées aux greffes apparentées HLA-identiques [310, 312].

Dans le cas des allogreffes de moelle osseuse (MO) ou de cellules souches périphériques (CSP) mobilisées par un facteur de croissance hématopoïétique tel que le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), le donneur sélectionné est idéalement un membre de la fratrie HLA-compatible. En l'absence de donneur familial, l'allogreffe sera effectuée à partir de CSP d'un donneur non apparenté HLA-compatible. La compatibilité est appréciée, en France, par le typage en biologie moléculaire des allèles A, B, C de classe I et DRB1, DQB1 de classe II. La compatibilité 10/10 et les protocoles actuels permettent une évolution similaire qu'il s'agisse d'un donneur apparenté ou non [313, 314]. En l'absence de donneur HLA-compatible, on peut avoir recours à la greffe de sang placentaire, qui contraint à

accepter un plus grand degré d'incompatibilité HLA (compatibilité de 5 à 6 antigènes majeurs HLA-A, B, DR), mais l'immaturation relative des cellules T issues du sang placentaire semble minimiser le risque de maladies du greffon contre l'hôte sévères, au moins dans le cas où les cellules d'une seule unité de sang placentaire sont greffées [315].

Dans le cas des allogreffes de moelle osseuse (MO) ou de cellules souches périphériques (CSP) sur lesquelles ont porté nos travaux, il subsiste toujours des disparités entre donneur et receveur malgré la compatibilité HLA 10/10 [316]. Une éventuelle disparité au locus *HLA-DP* ne peut être formellement exclue, quoique son impact sur l'évolution soit considéré comme moins dommageable que des disparités pour les autres loci [317]. De nombreux autres systèmes d'histocompatibilité ont été décrits, génétiquement localisés en dehors du complexe HLA. Ils dérivent de polymorphismes souvent bialléliques de gènes autosomiques ou portés par le chromosome Y ou encore le génome mitochondrial. Les antigènes correspondants sont dénommés antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHAgS).

Du point de vue des réponses lymphocytaires T, les antigènes mineurs d'histocompatibilité correspondent à des allopeptides présentables par une molécule du CMH partagée entre le donneur et le receveur, et obéissent donc aux règles de la présentation antigénique conventionnelle [318]. De ce fait, les possibilités de réponse aux mHAgS dépendent non seulement des disparités génétiques entre donneur et receveur, mais aussi des capacités d'enchâssement des allopeptides par les alléломorphes HLA, et donc des groupes HLA communs au donneur et au receveur. Les alloantigènes mineurs ont une distribution variable dans l'organisme, mais le fait essentiel pour l'alloréactivité est qu'ils sont présentables par les cellules dendritiques [319] et peuvent constituer des facteurs de risque de GVH (Tableau 1).

Le rôle des disparités en antigènes mineurs est révélé par le risque accru d'une allogreffe d'un donneur du genre féminin à un receveur du genre masculin, qui introduit une disparité pour les antigènes HY [320, 321]. Son impact est vérifié après analyse des disparités par typage moléculaire des principaux mHAgS [322-324]. L'impact des mHAgS dans l'effet GVL est mis en évidence chez l'Homme par le risque atténué de rechute en cas de disparités de genre entre donneur et receveur [325, 326] ; et par la corrélation entre l'obtention d'une rémission complète après injection de lymphocytes du donneur et l'identification concomitante de lymphocytes T spécifiques des mHAgS qu'exprimait le receveur mais non le donneur [327].

D'autres études ont souligné la notion que le chevauchement GVHD/GVL n'était pas absolu, puisque l'effet bénéfique GVL peut parfois s'exercer en absence de maladie du greffon contre l'hôte [328] et impliquer des clones anti-tumoraux de spécificité distincte des clones alloréactifs [329-331]. Si ces observations ouvrent des pistes de recherche intéressantes pour tenter d'éliminer les réponses alloréactives néfastes tout en préservant l'effet anti-tumoral, leur introduction dans la pratique clinique courante n'est pas envisageable à très court terme.

Facteurs de Risque de la GVH aiguë	Information	Référence
Disparité en locus HLA	Le risque de GVH aiguë augmente proportionnellement au nombre de loci (HLA-A, -B, -C et DRB1) incompatibles	[332, 333]
Type de donneur	Les patients ayant reçu un greffon provenant d'un donneur non apparenté ont plus de risque de développer une GVH aiguë II-IV	[313, 334, 335]
Source du greffon de CSH	Les patients ayant reçu des cellules souches périphériques obtenues par cytophérèse ont un plus grand risque de GVH aiguë que ceux ayant reçu de la moelle osseuse.	[316, 336, 337]
Type de conditionnement reçu	Les conditionnements atténués entraînant un degré de lymphopénie et d'inflammation moindre chez le receveur induisent un risque moins élevé de GVH aiguë	[287, 338-341]
Mismatch en antigène mineur et sexmismatch	L'existence de mismatches pour certains mHA est corrélé avec le développement d'une GvH aiguë. Plus particulièrement, les greffes HLA-identiques avec donneur féminin et receveur masculin entraînent un sexmismatch H-Y qui augmente le risque de GvH aiguë.	[316, 342]

Tableau 1 : Facteurs de risque majeurs de la GVH aiguë

4.4. L'effet de l'inflammation induite par les conditionnements

4.4.1. Rôle de l'inflammation aux temps précoces post-greffe

De nombreux travaux ont permis de mieux cerner la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë, qui est orchestrée par différents acteurs cellulaires et se déroule en 3 étapes : le dommage tissulaire péri-transplantation, l'activation des lymphocytes T apportés par le greffon et l'attaque des tissus cibles par des effecteurs cytotoxiques et les cytokines pro-inflammatoires [291, 292, 343].

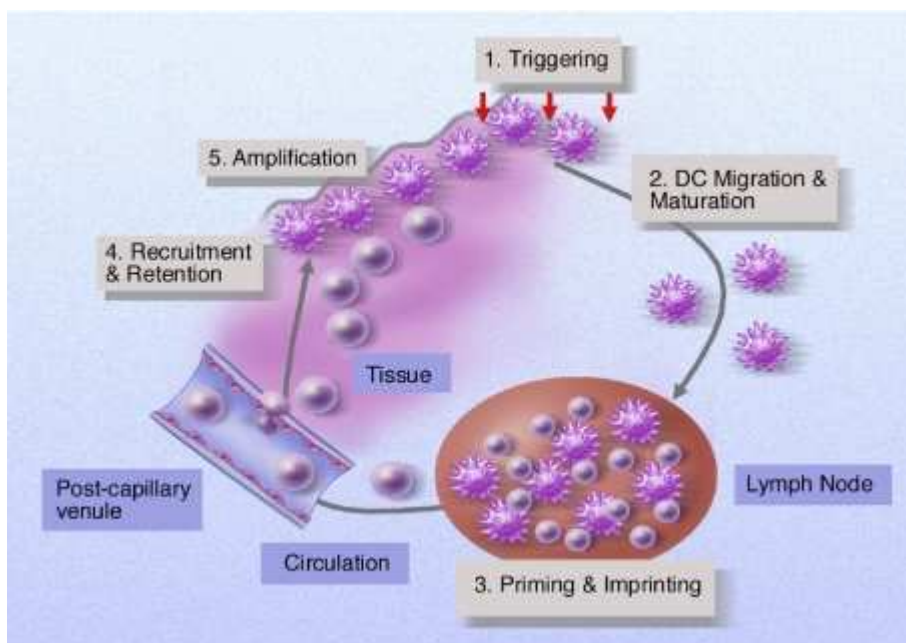


Figure 18 : Physiopathologie des réponses alloréactives [344]. L'agression tissulaire due au traitement de l'hémopathie maligne et au conditionnement pré-greffe (1) induit une inflammation propice à la maturation et la migration des cellules dendritiques (2) qui vont présenter leurs alloantigènes aux lymphocytes T alloréactifs dans le ganglion de drainage et leur imposer une « empreinte tissulaire » (3) permettant leur domiciliation préférentielle dans les tissus correspondants (4). Les effecteurs infiltrant les tissus cibles y induisent des lésions et entretiennent l'inflammation (5), créant un cercle vicieux qui entretient et amplifie les réponses alloréactives.

Les dommages tissulaires à l'origine de la cascade pathogène sont consécutifs à de la chimiothérapie, associée ou non à l'irradiation corporelle totale pour le conditionnement pré-greffe. Ainsi sont générées et libérées de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF en particulier) qui concourent à la maturation des cellules présentatrices d'antigène [290, 345]. Cet « orage cytokinique » est amplifié et complété par l'altération des barrières muqueuses qui entraîne, par translocation bactérienne, l'exposition aux endotoxines et l'engagement consécutif des récepteurs de « danger » des cellules tissulaires, des macrophages et des cellules dendritiques [346, 347].

En réponse à ces signaux, les cellules dendritiques du receveur vont exprimer fortement à leur surface des molécules HLA, ayant pour certaines enchaîné des allopeptides. Elles expriment également des ligands capables d'induire des signaux de costimulation et des cytokines comme l'IL-12, capables d'orienter la différenciation des lymphocytes T en voie d'activation (« troisième signal »).

Selon la nature des mHAGs, il peut s'agir d'un mécanisme d'alloprésentation directe (si la cellule dendritique exprime l'allèle correspondant) ou indirecte (si la cellule dendritique a capté la protéine polymorphique libérée par une cellule tissulaire lésée ou qui a réagi aux cytokines pro-inflammatoires) [348]. Sous l'effet notamment du TNF, les cellules dendritiques se mobilisent vers les organes lymphoïdes où la production des chimiokines lymphoïdes CCL19 et CCL21 est respectée par le conditionnement et où s'effectuera la rencontre avec les lymphocytes T [349].

L'importance de cette rencontre est soulignée par l'inhibition de la réaction du greffon contre l'hôte expérimentale conférée par un antagoniste de CCL21 [350] ou l'invalidation du gène du récepteur CCR7 [351] et visualisée *in vivo* par l'analyse des étapes précoces de la réaction expérimentale [6, 349].

L'importance de l'inflammation est soulignée par les modèles expérimentaux, qui montrent que la fonctionnalité des lymphocytes T, en expansion homéostatique périphérique et ayant acquis un phénotype « memory-like », est optimisée si les animaux ont subi une irradiation préalable favorisant la translocation bactérienne et ses conséquences adjuvantes [352-354]. A l'inverse, la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte expérimentale est réduite si les souris irradiées sont maintenues en conditions gnotobiotiques [355]. Le contexte inflammatoire est également connu chez l'homme pour promouvoir le rejet d'allogreffes d'organe [356] et l'administration d'anti-TNF durant le conditionnement permet de retarder et réduire la maladie du greffon contre l'hôte [357].

A ce stade initial des allogreffes de CSH, les cellules dendritiques de l'hôte, respectées par le conditionnement, jouent un rôle déterminant dans l'induction des réponses aux alloantigènes et l'initiation de la réaction du greffon contre l'hôte aiguë [292, 344, 345, 358, 359]. Selon leur type et leur lieu de résidence tissulaire, les cellules dendritiques sont à même d'imposer au moins transitoirement une domiciliation préférentielle aux lymphocytes T alloréactifs qu'elles activent, ce qui concourt au ciblage tissulaire des mécanismes effecteurs de la réaction du greffon contre l'hôte [360, 361].

4.4.2. Résolution progressive de l'inflammation et possibilités de complications tardives post-greffe

La durée de vie des cellules dendritiques étant limitée, les cellules dendritiques de l'hôte seront progressivement remplacées par des cellules dérivées des CSH greffées, selon une cinétique dépendante de l'intensité du conditionnement et du type de cellules dendritiques [362-364]. Un mécanisme semi-direct ou indirect de présentation des mHAgS prédomine alors. Toutefois, un certain degré de chimérisme des cellules dendritiques persistera longtemps, grâce à la génération de cellules de Langerhans et de cellules dendritiques dermiques à partir des précurseurs tissulaires radio-résistants du receveur [365].

De manière concomitante, on assiste, au cours des mois qui suivent la greffe, à une diminution progressive de l'inflammation. Cette résolution entraîne d'une part, une diminution de l'activation des cellules dendritiques résiduelles du receveur pour lesquelles la présentation peptidique devient non immunogène ; et d'autre part, une absence de maturation et d'activation des cellules dendritiques nouvellement produites à partir des CSH du donneur. Parallèlement, on observe un ensemencement progressif du CLTP par production *de novo* de cellules T, d'importance variable selon les capacités du thymus de l'hôte. Ces nouveaux lymphocytes, éduqués dans le thymus du receveur peuvent concourir à l'établissement d'une tolérance de transplantation, qui s'observe effectivement chez certains patients indemnes de morbidité liée à la greffe.

Ce n'est cependant pas toujours le cas, et on assiste alors, chez certains patients, à des phénomènes d'alloréactivité tardive qui se manifestent par le développement d'une maladie du greffon contre l'hôte chronique. Les mécanismes de développement de la GVH chronique associent aux réponses alloréactives des processus analogues à ceux impliqués dans la survenue de maladies auto-immunes. D'une part, les lymphocytes T du donneur qui ont réalisé leur expansion homéostatique persistent en s'auto-renouvelant chez le receveur, et ils peuvent développer ou conserver des réponses alloréactives favorisées par toute source d'inflammation, liée par exemple à une infection. D'autre part, les lymphocytes T nouvellement produits, vont s'éduquer dans le thymus du receveur, donc au contact des peptides dérivés des alléломorphes du receveur, ce qui permet l'établissement de la tolérance, mais plusieurs facteurs peuvent s'y opposer. La sélection négative s'effectue au contact des cellules épithéliales thymiques ou des cellules dendritiques peuplant la médulla [366]. Or l'épithélium thymique peut être agressé par le conditionnement pré-greffe et en conserver des séquelles [367, 368] ou subir les effets délétères d'une réaction du greffon contre l'hôte [283, 369, 370]. Quant aux cellules dendritiques résidentes de la médulla, elles seront progressivement remplacées à partir des cellules souches greffées, qui expriment donc un panel de peptides correspondant aux alléломorphes du donneur et non plus du receveur. Les cellules dendritiques thymiques peuvent aussi capter des protéines circulantes, et des cellules dendritiques périphériques peuvent migrer vers le thymus [371-373], et autoriser de ce fait la sélection négative des thymocytes vis-à-vis d'alléломorphes de type donneur exprimés en périphérie. Ces possibilités, en l'occurrence, bénéfiques peuvent toutefois être réduites en cas d'inflammation périphérique [372]. Les lymphocytes T non tolérants issus du thymus contribueront alors au développement de la maladie du greffon contre l'hôte chronique [374].

L'induction des réponses impliquées dans l'effet GVL obéit vraisemblablement à un mécanisme similaire. Dans les proliférations myéloïdes, des cellules dendritiques dérivées de précurseurs leucémiques pourraient présenter directement leurs peptides antigéniques [375, 376], mais elles peuvent aussi être anergisantes [377], d'où l'importance des mécanismes de présentation indirecte des allopeptides ou des antigènes tumoraux.

4.5. L'intensité du conditionnement détermine le degré de lymphopénie et le degré d'inflammation

Différents protocoles de conditionnement pré-greffe sont maintenant utilisés, prenant en compte leur toxicité confrontée à l'âge du receveur et les co-morbidités. Les conditionnements myéloablatifs ont un niveau élevé de toxicité et induisent une lymphopénie totale. On peut proposer depuis une quinzaine d'années des conditionnements moins toxiques, dits d'intensité réduite (RIC) voire non myéloablatifs [287, 378].

Il existe cependant une grande hétérogénéité au sein des conditionnements d'intensité réduite, avec induction de degrés variables de lymphopénie. Par exemple, l'association Fludarabine-Busulfan-sérum anti-lymphocytaire entraîne un niveau de lymphopénie quasi-identique à celui observé après les conditionnements dits myéloablatifs.

Les conditionnements d'intensité réduite entraînent un degré d'inflammation moins intense dans les premières semaines post-allogreffe [379]. Effectivement, les taux d'un marqueur classique de l'inflammation, la protéine C réactive (CRP), s'élèvent moins que suite aux préparations myéloablatives [380], et les taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires sont peu modifiés durant les 3 mois qui suivent l'allogreffe, avec cependant un pic d'IL-12p70 associé aux grades sévères de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë [381].

On s'attendait donc à un risque moindre de maladie du greffon contre l'hôte après conditionnement atténué. Si plusieurs études ont en effet retrouvé une incidence diminuée [287, 338-341], d'autres ne montrent pas d'impact significatif du type de conditionnement sur le risque de cette complication [382-385]. Ces divergences peuvent s'expliquer en partie par la variété des protocoles utilisés [301, 334, 386, 387] ou la persistance du chimérisme mixte donneur/receveur. Le chimérisme hématopoïétique a effectivement des conséquences variables selon son degré et sa durée. Il peut favoriser l'établissement d'une tolérance du greffon [388], mais il peut au contraire accroître le risque de rejet du greffon ou réduire son effet GVL [389, 390]. En effet, plusieurs études avec un recul de 3 ans ont retrouvé un risque de rechute plus élevé [391, 392]. L'injection de lymphocytes du donneur (DLI), quand elle est réalisée à temps, peut y remédier [393].

Les indications des protocoles standards ou d'intensité réduite ne s'appliquent pas nécessairement aux mêmes patients et le potentiel prolifératif de l'hémopathie reste un facteur essentiel à considérer dans le risque de rechute. Toutefois, si des protocoles très lymphopénisants exposent à un risque équivalent de maladie du greffon contre l'hôte, en dépit de l'induction d'un degré variable d'inflammation, on peut en déduire que l'expansion homéostatique périphérique des lymphocytes T du donneur est un facteur déterminant de l'évolution bénéfique ou défavorable de l'allogreffe de CSH. Si cette hypothèse se vérifie, la production et les effets des cytokines homéostatiques auraient un rôle crucial.

4.6. Impact des cytokines homéostatiques sur les événements post-greffe

Plusieurs équipes se sont intéressées à l'implication de l'IL-7 ou de l'IL-15 dans le devenir de la greffe, et plus particulièrement dans la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë et de la rechute. L'IL-12, cytokine pro-inflammatoire, a également fait l'objet de quelques études.

4.6.1. IL-7 et évènements post-greffe

Dans un modèle murin invalidé pour l'IL-7 ayant reçu une greffe allogénique de moelle osseuse, Chung *et al.* n'observent pas de maladie du greffon contre l'hôte, mais après des injections d'IL-7 recombinante par voie sous cutanée, une augmentation significative de l'incidence de maladie du greffon contre l'hôte aiguë est obtenue [394]. L'effet aggravant de l'IL-7 n'est par contre pas retrouvé dans un autre modèle utilisant une allogreffe appariée au CMH murin et l'effet GVL est également inchangé. Ce résultat est attribué à la répression d'expression du récepteur CD127 par les cellules alloréactives [395, 396]. Au total, l'IL-7 délivrée par transfection de cellules souches mésenchymateuses régulatrices n'aggraverait pas non plus le risque de maladie du greffon contre l'hôte [397]. Inversement, l'utilisation d'un anticorps anti-IL-7R α , bloquant l'interaction de la cytokine avec son récepteur, prévient le développement de la maladie du greffon contre l'hôte [398].

Cet effet semble indépendant d'un contexte inflammatoire, puisque l'administration d'IL-7 recombinante aggrave également la maladie du greffon contre l'hôte aiguë dans un modèle de greffe d'un parent à l'hybride de première génération et réduit la dose seuil de lymphocytes T à transférer [258]. Toujours dans les modèles expérimentaux, l'effet de l'administration d'IL-7 sur la maladie du greffon contre l'hôte est estompé par l'intensité du conditionnement s'il inclut une irradiation sublétales ou létale [368].

L'ensemble de ces études expérimentales a conduit à émettre des réserves quant aux possibilités d'utilisation de l'IL-7 recombinante dans le contexte de la transplantation [399] alors que ses effets bénéfiques sur la reconstitution lymphocytaire T après chimiothérapie intense pour tumeur solide semble envisageable avec une tolérance acceptable après étude de phase I [144, 400].

Dans une étude prospective chez 31 adultes receveurs d'allogreffe de CSH après conditionnement d'intensité réduite (Fludarabine/Cyclophosphamide) mais précédé d'une induction entraînant une lymphopénie sévère (0-69 cellules CD3⁺ avant la greffe, médiane 3/ μ L), Mackall *et al* observent une franche augmentation des taux plasmatiques d'IL-7 avec une valeur à 7 jours post-greffe corrélée en analyse multivariée à la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë chez ces patients [401]. Par contre, cette association n'est pas retrouvée dans d'autres études comparant différentes indications d'allogreffe de CSH chez 11 [402] ou 32 enfants receveurs d'allogreffe [97].

4.6.2. IL-15 et évènements post-greffe

Blaser *et al.* ont utilisé un modèle murin d'allogreffe avec une souris donneuse transgénique pour l'IL-15. Ils montrent une plus grande infiltration de monocytes au niveau intestinal associée à une nécrose tissulaire plus importante que dans leur modèle d'allogreffe contrôle. De plus, la présence d'IL-15 augmente l'expansion des LT CD8⁺CD43⁺ effecteurs mémoires alloréactifs, leur survie et leur production d'IFN γ [259].

Le suivi des taux sériques d'IL-15 associe la persistance de taux élevés d'IL-15 plasmatique au-delà de la deuxième semaine à la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë sévère (grade 3-4) [403, 404]. Par contre, un autre rapport ne retrouve pas cette relation après allogreffes pédiatriques [402]. Plus récemment, une autre équipe observe une augmentation plus marquée des taux sériques d'IL-15 durant le premier mois post-allogreffe chez 19 de leurs 27 patients qui développent une maladie du greffon contre l'hôte aiguë, mais sans corrélation avec le grade [405]. L'analyse de survie classifiant 34 receveurs adultes selon leur taux sérique d'IL-15 à 90 jours post-greffe révèle l'association avec une maladie du greffon contre l'hôte aiguë de grade 2 à 4. Dulphy et coll. rattachent cette association à l'expansion des cellules NK de phénotype CD56^{fort} capables de sécréter de l'interféron- γ tout en évoquant un effet de possible de cette cytokine sur les lymphocytes T alloréactifs [406]. Les relations des taux d'IL-15 et la rechute n'ont pas été décrites à notre connaissance.

Dans la transplantation d'organe, la quantité d'IL-15 circulante a été à plusieurs reprises associée au rejet de celui-ci. Chez des patients ayant reçu une transplantation de poumon, un taux élevé d'IL-15 dans le liquide broncho alvéolaire de (LBA) a été mis en évidence chez les patients présentant en rejet [407]. Cette observation a également été faite dans le cadre de transplantation de foie [408, 409] ou de rein [410]. L'IL-15 intervient dans ce contexte comme facteur pro-inflammatoire participant à l'activation des monocytes dans les tissus et à la prolifération des cellules T cytotoxiques responsables de la destruction de l'organe.

4.6.3. IL-12 et évènements post-greffe

Une autre cytokine pro-inflammatoire, IL-12p70, essentiellement produite par les cellules myéloïdes a été étudiée, en raison de son rôle dans la différenciation des lymphocytes de type Th1 ou Tc1 (producteurs d'interféron- γ et de TNF) et la génération des réponses des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques intervenant dans la physiopathologie de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë ou l'effet GVL. Dans une étude prospective réalisée chez 113 receveurs d'allogreffe de CSH après conditionnement d'intensité réduite, le taux plasmatique d'IL-12p70 à un mois après l'allogreffe est plus élevé chez les patients développant une GVH aiguë de grade 2-4 [381]. Dans une autre étude prospective chez 134 receveurs (dont 2/3 de conditionnements myéloablatifs), l'analyse multivariée objective une relation négative entre les taux plasmatiques d'IL-12 et la rechute, mais pas de relation entre ces taux et la maladie du greffon contre l'hôte aiguë ou chronique. Ces résultats s'accordent avec les effets ambivalents de l'administration d'IL-12 dans les modèles murins, qui favorisait [411, 412] ou au contraire inhibait le développement de la maladie du greffon contre l'hôte mais amplifiait l'effet GVL [413-415].

5) Les objectifs de nos études chez les receveurs d'allogreffe de CSH

Une étude prospective analysant 80 patients, pour la plupart adultes, après conditionnement myéloablatif et allogreffe de CSH avait permis à notre équipe de comparer la dynamique de repopulation du compartiment lymphocytaire circulant entre les sujets qui restent indemnes de toute complication clinique et ceux qui ont souffert d'une rechute de leur hémopathie maligne. L'analyse multivariée permettait d'objectiver qu'une médiocre reconstitution de la population T CD8⁺, attestée par le nombre réduit des cellules les plus différenciées (CD8⁺CD28^{négatives}) à 60 jours post-greffe, représentait un facteur de risque significatif de la survenue ultérieure de la rechute (délai médian de 217 jours, extrêmes 85 à 561 jours).

Considérant l'importance d'une reconstitution quantitativement et qualitativement efficace pour prémunir les receveurs du risque de rechute, mais aussi les intrications exposées ci-dessus entre les effets GVL et GVH, notre principal objectif était de réaliser une étude prospective analysant conjointement la cinétique des deux principales cytokines homéostatiques, l'IL-7 et l'IL-15, chez des receveurs d'allogreffe de CSH. Cette exploration a été complétée par l'analyse du degré d'expression des récepteurs des cytokines homéostatiques, l'IL-7R α (CD127) et l'IL-15R β (CD122) sur les sous-populations de cellules T naïves et mémoires. Ces données ont été confrontées aux deux complications majeures que sont la maladie du greffon contre l'hôte aiguë et la rechute de l'hémopathie maligne.

Nous avons débuté cette étude avec une cohorte de receveurs de CSH la plus homogène possible, ayant reçu un conditionnement myéloablatif et une allogreffe de moelle. Cette étude a été complétée avec une cohorte de patients recevant un conditionnement d'intensité réduite.

Il a donc été possible de comparer, selon des deux types de conditionnement, l'impact du degré de lymphopénie et d'inflammation sur les taux systémiques d'IL-7 et d'IL-15, l'expression de leurs récepteurs par les lymphocytes T circulants et l'évolution clinique. L'interprétation de ces résultats a nécessité une étude préliminaire menée chez les sujets adultes sains, afin d'évaluer ces paramètres dans les conditions basales, en situation d'homéostasie lymphocytaire non perturbée.

MATERIEL ET **METHODES**

1) Sujets

- Les sujets sains :

Trente et un donneurs volontaires sains âgés de 19 et 60 ans (médiane = 30), 18 femmes et 13 hommes ont été inclus dans cette étude après information et signature du formulaire de consentement éclairé en accord avec la déclaration d'Helsinki. Nous nous sommes assurés que les sujets ne présentaient pas de signes récents d'activation lymphocytaire, d'antécédent de maladie inflammatoire chronique ou de prise récente de médicament pouvant entraîner des répercussions sur le système immunitaire. L'expression de l'IL-7R α pouvant être influencée par les rythmes circadiens [150], nous nous sommes attachés à recueillir un prélèvement de sang veineux sur EDTA le matin entre 8 et 11h.

- Les receveurs d'allogreffe :

Entre Octobre 2006 et Avril 2010, plus de 150 receveurs de CSH ont été suivis prospectivement après avoir été informés et avoir signé un formulaire de consentement éclairé. Le protocole a préalablement reçu l'avis favorable du CCP.

Nous avons pu étudier prospectivement 2 cohortes :

- 1- Une cohorte de 63 patients ayant reçu une allogreffe de moelle osseuse après un conditionnement myéloablatif (MA) comprenant une irradiation corporelle totale (12 Gy) et une chimiothérapie ou une chimiothérapie seule. Les patients étaient en rémission complète (n= 48), en réponse partielle (n= 10), en phase de progression de la maladie (n= 1) ou en rechute (n= 4). L'étude des 40 premiers receveurs inclus a donné lieu à une première publication dans la revue Bone Marrow Transplantation (Page 28). Les caractéristiques de ces receveurs sont décrites dans la Table 1 de cet article.
- 2- Une cohorte de 45 patients ayant reçu une allogreffe de CSH (MO n= 22 ; CSP n= 23) après un conditionnement atténué (RIC). Les patients étaient en rémission complète (n= 20), en réponse partielle (n= 14), en phase de progression de la maladie (n= 9) ou en rechute (n= 2). Leurs caractéristiques sont décrites dans la Table 1 du deuxième article en presse Page 37.

Tous les patients ont reçu un greffon de CSH non manipulée en compatibilité HLA allélique 10/10 (HLA-A, B, C,DR et DQ). Tous les patients ont reçu un traitement prophylactique standard de la GVH composé de cyclosporine A et de méthotrexate (J+1, +2 et +6). Une prophylaxie contre *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma*, infections fongiques et herpes simplex virus a été administrée durant la phase de neutropénie. Les patients ont été suivis prospectivement avec une médiane de plus d'un an, en particulier pour les données suivantes:

- Immunosuppression post-greffe
- Prise ou rejet de greffe
- GVH aiguë quelque soit la date de survenue car les receveurs ayant eu un conditionnement réduit peuvent présenter des GVH retardées [330]. Le grade (sur la base des critères standards) [278], le traitement et l'évolution ont été colligés.
- GVH chronique (date de survenue, traitement, évolution)
- Rechute de la maladie sous-jacente
- Infections

Des prélèvements de sang sur EDTA ont été obtenus avant le début du conditionnement, le jour de la transplantation avant l'infusion de la poche (J0), puis régulièrement après la greffe à J+7, J+14, J+18, J+25, J+30, J+60, J+90.

2) Dosage de l'IL-7, l'IL-15, l'IL-2R α et de la protéine C-Réactive (CRP)

Le plasma a été obtenu par centrifugation du sang total prélevé sur EDTA à 4000 tours/min pendant 10 minutes dans les 6 heures suivant le prélèvement sanguin, puis congelé sous forme d'aliquote de 500 μ L à -80°C jusqu'au jour du dosage. Les concentrations plasmatiques d'IL-2R α soluble (EIA sIL-2R, Immunotech), d'IL-7 (Quantikine high sensitivity, R&D systems) et d'IL-15 (Quantikine Elisa, R&D systems) ont été mesurées en duplicate suivant une technique immuno-enzymatique sur plaque (ELISA) d'après les instructions du fournisseur. Le seuil de détection de l'IL-2R α soluble est de 5 pg/mL (CV intra essai = 5,5%, CV inter essai = 13,5%,) celui de l'IL-7 est de 0,1 pg/mL (CV intra essai = 8,9%, CV inter essai = 7,5%,) et celui de l'IL-15 plasmatique est de 2pg/mL (CV intra essai = 3,9%, CV inter essai = 8,2%).

La protéine C-réactive a été mesurée par un automate turbidométrique (Tina-quant CRP; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3) Expression des récepteurs de cytokines homéostatiques: IL-7R α (CD127) et IL-15/2R β (CD122)

Nous choisissons de travailler directement sur sang total (7 ml sur EDTA) en suivant les procédures décrites par Saule [12], car l'isolement des cellules mononucléées sur gradient de densité entraîne un biais dans la récupération des sous-populations et notamment au sein des cellules T CD8⁺ [416]. De plus, l'immunodétection du CD127 sur cellules mononucléées isolées conduit à une perte partielle d'expression sur les cellules CD4⁺ mais surtout sur les cellules CD8⁺ [417].

Tous les immunomarquages lymphocytaires ont été réalisés sur sang total et analysés dans les 6h suivant le prélèvement. La lyse des globules rouges est pratiquée après les étapes d'immunomarquage (simple ou multiples) avec un agent de lyse (immunoprep reagent system, Beckman Coulter) à l'aide d'un automate (T-QPREP, Beckman Coulter). Après cette étape de lyse, deux lavages en tampon isotonique sont nécessaires avant lecture au cytomètre en flux (FC500, Beckman Coulter)

Pour chaque sujet testé, sept combinaisons différentes d'anticorps monoclonaux sont préparées (Tableau n°1) et trois immunomarquages simples (CCR7APC, CD122PE, CD127PE) et un contrôle isotypique (mouse IgG1 en PE, R&D systems) complètent le panel d'analyse pour permettre de valider les immunomarquages multiples.

Tube n°	Combinaison de marqueurs	Informations apportées
1	CD3 PE / CD4 FITC / CD8 Pc5 / CD45 PC7	- Equilibre entre les principales populations lymphocytaires circulantes et numération
2	CD3 FITC/ CD45 Pc7 / CD19 Pc5 / CD56 PE	
3	CD4 Pc7 / CD8 Pc5 / CD56 FITC / HLA-DR PE	- Etat d'activation des cellules T
4	CD4 Pc7 / CD122 PE / CCR7 APC / CD45RA FITC	- Expression de l'IL-2/15R β (CD122) sur les sous-populations T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïves et mémoires
5	CD8 Pc7 / CD122 PE / CCR7 APC / CD45 RA FITC	
6	CD4 Pc7/ CD127 PE / CCR7 APC / CD45RA FITC	- Expression de l'IL-7R α (CD127) sur les sous-populations T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïves et mémoires
7	CD8 Pc7 / CD127 PE / CCR7 APC / CD45RA FITC	

Tableau 2 : Combinaisons d'anticorps préparés afin d'évaluer l'expression de l'IL-7R α et de l'IL-2/15R β sur les sous-populations T CD4⁺ et CD8⁺, naïves et mémoires

(PE= phycoérythrine, Pc5= phycoérythrine-cyanine 5, Pc7= phycoérythrine-cyanine 7, APC = Allophycocyanine, FITC= Fluoresceïn Iso-Thiocyanate)

La numération lymphocytaire est obtenue par technique de comptage par bille : 100 μ l d'une solution de billes (Flowcount fluruorospheres, Beckman Coulter) sont ajoutés à 100 μ l de sang après les étapes de lyse et de lavage décrites précédemment, et une numération est réalisée sur le cytomètre FC500 après homogénéisation.

Quatre quadruples marquages ont été mis au point pour évaluer, par cytométrie en flux, l'expression de l'IL-7R α (CD127) et l'IL-2/15R β (CD122) à la surface des cellules T naïves et des différentes cellules T mémoires. Les sous-populations de cellules T ont été caractérisées en fonction de leur expression membranaire de deux marqueurs, le CCR7 et le CD45RA, en adéquation avec la classification de Sallusto [4]. Les protocoles, mis au point sur le cytomètre FC500, ont été programmés pour une analyse portant sur au moins 10 000 lymphocytes, repérés selon leurs critères de taille et de structure et l'expression du CD45. Ce seuil ne peut souvent être atteint chez les receveurs que plusieurs mois après l'allogreffe. Nous avons retenu les patients pour lesquels nous avons analysé un minimum de 2500 lymphocytes viables.

L'immunodétection du CCR7, du CD122, et à moindre degré du CD127, est délicate car il s'agit de marqueurs à distribution continue, faiblement ou non exprimés, sur certaines sous-populations T. L'optimisation de l'immunodétection a été faite en comparant les profils de fluorescence en immunomarquage simple et multiple. Nous avons eu, pour certains sujets, des discordances lors des quadruples marquages associant le CD8 et le CCR7. Ces sujets ont été écartés de l'étude. Pour évaluer l'expression membranaire du CD127 et du CD122, nous avons choisi des anticorps couplés à la PE pour disposer d'un rendement quantique suffisant. Le signal obtenu avec l'anticorps anti-CD122 comporte un pic de forte intensité, correspondant majoritairement à des cellules NK CD3^{neg}CD56⁺, mais aussi un signal continu de faible intensité correspondant aux cellules T. Pour analyser au mieux nos quadruples marquages, un contrôle isotypique marqué à la PE (fluorochrome également utilisé pour la détection des récepteurs des cytokines) a été inclus pour chaque sujet étudié afin de définir rigoureusement le seuil de positivité (Figure 19A). L'analyse du CD122 et du CD127 a été réalisée en pourcentage de cellules positives et en densité membranaire (MFI).

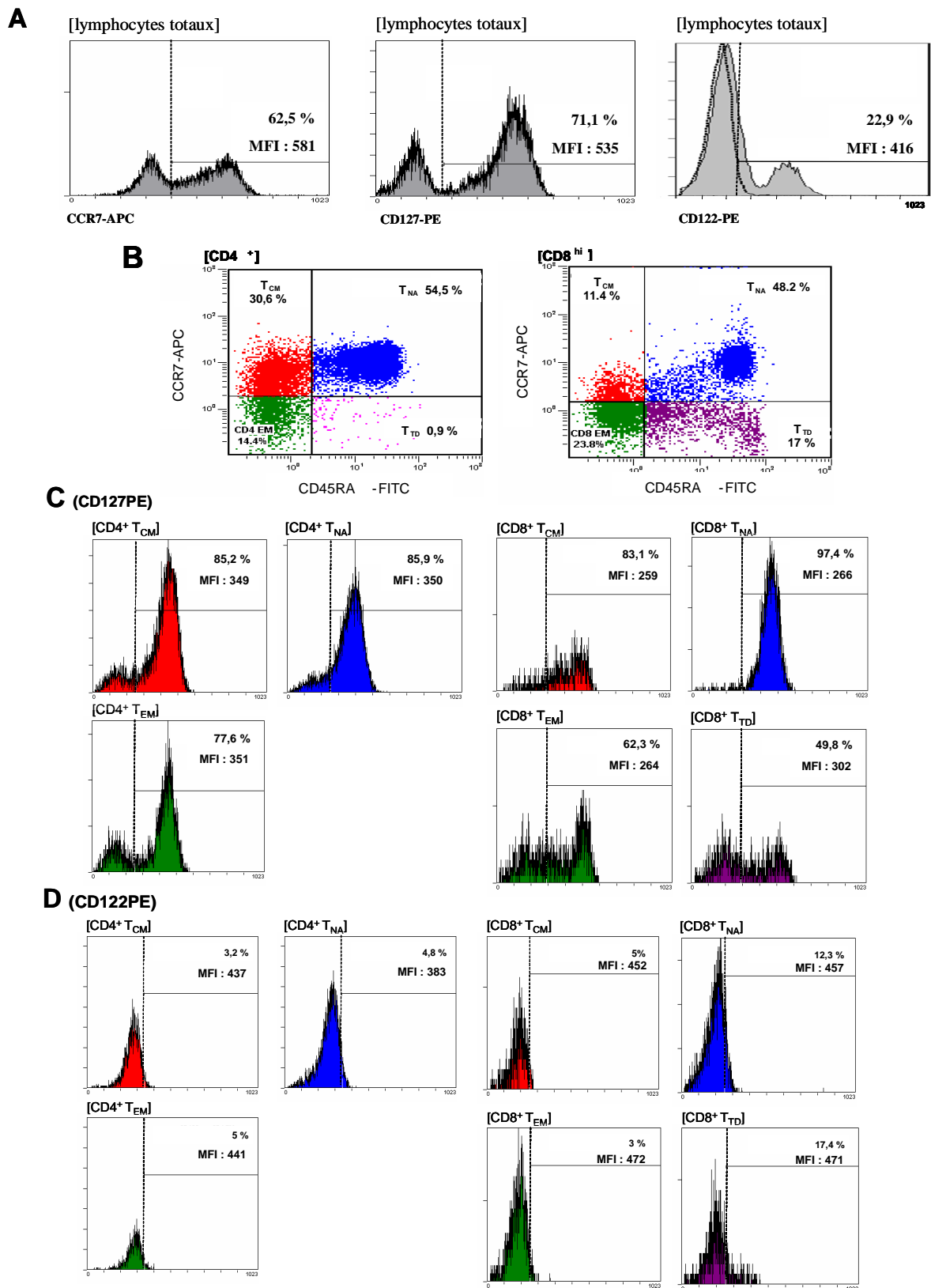


Figure 19 : Modalités d'analyse de l'expression des récepteurs de cytokines CD127 et CD122 sur les sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺ chez un sujet représentatif (A) Profil d'expression membranaire des molécules CCR7, CD127 et CD122 sur lymphocytes totaux. Le trait vertical définit le seuil de positivité. Dans le cas du CD122, le profil du contrôle isotypique est figuré en pointillé. (B) Histogrammes biparamétriques illustrant la répartition des sous-populations naïves et mémoires au sein des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. (C) Analyse de l'expression du CD127 (% et médiane d'intensité de fluorescence (MFI)) après conditionnement sur 100% de cellules CD4⁺ ou CD8⁺ T_{NA}, T_{CM}, T_{EM} ou T_{TD} (pour les CD8⁺). (D) Analyse de l'expression du CD122 (% et MFI) après conditionnement sur 100% de cellules CD4⁺ ou CD8⁺ T_{NA}, T_{CM}, T_{EM} ou T_{TD} (pour les CD8⁺).

Nous avons également cherché à analyser l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-15. Malgré l'utilisation de différentes sources commerciales d'anticorps, nous ne sommes parvenus à aucun signal analysable de manière reproductible, y compris après essai sur cellules mononucléées isolées. Nous n'avons donc pas intégré l'étude de ce marqueur, ce qui ne pénalise pas nos résultats puisque l'expression de la chaîne alpha de l'IL-15R n'est pas indispensable à la réceptivité à l'IL-15 à une cellule donnée.

Pour chaque quadruple marquage, nous avons déterminé le pourcentage de cellules exprimant le CD127 et le CD122 au sein de chacune des sous-populations T CD4⁺ et CD8⁺ naïve et mémoires (Figure 19C et 19D) et mesuré dans chaque cas la médiane de fluorescence (MFI). Nous nous sommes attachés à vérifier, après réglages appropriés sur le cytomètre FC500, la concordance des MFI du CD122 et du CD127 entre les quadruples marquages portant sur les cellules CD4⁺ et CD8⁺, afin d'autoriser une comparaison des densités d'expression entre ces deux types de cellules T.

En ce qui concerne les cellules T CD8⁺, seules les cellules exprimant fortement le CD8 (CD8^{hi}) ont été prises en compte, pour écarter de notre analyse certaines cellules NK exprimant faiblement la molécule CD8. Compte tenu du faible pourcentage de cellules T_{TD} CD4⁺ (<5%), l'analyse de l'expression des récepteurs CD122 et CD127 sur cette sous-population n'a pas été prise en compte.

4) Détection des polymorphismes nucléotides simples (SNPs) par amplification spécifique de séquence en PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase)

L'ADN des donneurs a été obtenu par une méthode de réduction de la solubilité (« salting out modifié ») mise au point et décrite par Miller [418].

La détection des SNPs a été réalisée telle que décrite par Shamin *et al.* [419]. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 10 μ l avec l'amorce contrôle (0.2 μ M) ou l'amorce spécifique (0.5 μ M) (Tableau 3), 50 ng d'ADN, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, du tampon de PCR (50mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.4), et 0.4 unités de Taq polymérase. L'automate GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a été utilisé pour l'amplification. Pour chaque échantillon, 2 ml de tampon de charge a été ajouté, et les échantillons ont été analysés sur gel d'agarose 2.5% marqué au bromure d'éthidium.

SNPs	Nom du primer	Séquence	Taille (bp)
+510 C/T	IL7Rex2R1g	5'-ATTTCAAATTCCAGATTGGTGG-3'	319
	IL7Rex2R2a	5'-TATTTCAAATTCCAGATTGGTGA-3'	
	IL7Rex2F	5'-GGT TGG TTG GTT TTG AAG CAT-3'	
+1237 A/G	IL7Rex4R1t	5'-TTGGCTCCTTCCCGATAGAT-3'	139
	IL7Rex4R2c	5'-TGGCTCCTTCCCGATAGAC-3'	
	IL7Rex4F2	5'-GTGAC TTGCAGAGGA GATGA-3'	
+2087 T/C	IL7Rex6R1a	5'-GAAAAAACTCAAAATGCTGATGA-3'	1000
	IL7Rex6R2g	5'-GAAAAAACTCAAAATGCTGATGG-3'	
	IL7Rex6F	5'-AAC CGG CAG CAA TGT ATG AG-3'	

Tableau 3 : Description des séquences des amorces utilisées pour la recherche des polymorphismes de l'IL-7R α en PCR

5) Statistiques

La comparaison des fréquences a été analysée par un test de Fisher. La distribution des valeurs individuelles ne peut être assimilée à une distribution gaussienne pour certains paramètres. Les résultats sont donc présentés sous la forme médiane (25^{ème}-75^{ème} percentile). Le coefficient de variation (CV) est calculé comme le rapport à la médiane de l'intervalle (75^{ème}-25^{ème}) percentile. L'étude des corrélations a été réalisée par le test non paramétrique de Spearman. La concordance (corrélation multiple) entre plusieurs séries de valeurs a été estimée grâce au test non paramétrique W de Kendall. Pour comparer l'expression des récepteurs de cytokines homéostatiques dans les différentes sous-populations T, le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test (test de comparaison multiple de Dunn) a été utilisé. Le seuil de significativité retenu à priori pour chacun des tests est $P < 0,05$.

Les valeurs médianes d'IL-7 et d'IL-15 sont utilisées pour stratifier les patients pour les analyses en Kaplan-Meier. Les différences entre les strates sont évaluées par un test de Log-rank. Les analyses multivariées sont réalisées par un modèle de Cox en utilisant une valeur de $P < 0,05$ pour l'inclusion et l'exclusion des variables. Toutes les analyses sont réalisées avec SPSS software (SPSS v11.5, Chicago, IL).

RESULTATS

Partie 1 : Taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 et expression des chaînes IL-7R α (CD127) et IL-2/15R β (CD122) par les sous-populations de lymphocytes T naïfs et mémoires chez les sujets adultes sains et en situation d'homéostasie lymphocytaire.

1) Composition du CLTP et taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15

Pour se placer en situation d'homéostasie lymphocytaire, nous avons vérifié l'absence des stigmates d'activation récente du système immunitaire chez tous les sujets sains testés et écarté tous les sujets présentant un pourcentage élevé de cellules HLA-DR⁺ ou ayant un taux d'IL-2R soluble plasmatique augmenté. Pour l'ensemble des individus adultes sains retenus, les pourcentages médians de cellules positives pour HLA-DR étaient: CD4⁺HLADR⁺= 3% (étendue : 1,3-8,3) ; CD8⁺HLADR⁺= 3,8% (étendue : 0,8-9,5). Ces faibles pourcentages d'expression de HLA-DR⁺ sur les cellules T sont communément admis comme reflétant une absence d'activation cellulaire T cliniquement significative. La médiane d'IL-2R α soluble était de 2,6 ng/mL (étendue : 1,7-3,4), ce qui est en accord avec les taux retrouvés chez les sujets sains (médiane = 3,8 ng/mL, étendue : 0,1 \pm 8,8 ng/mL) [420].

Comme dans de nombreuses études, nous avons regroupé les sujets sains dans une même tranche d'âge puisqu'il s'agissait de sujets adultes entre 18 et 60 ans. Il existe une variation inter-individuelle de la lymphocytose T (CV)= 29%). Les cellules naïves (CCR7⁺CD45RA⁺) prédominent avec un pourcentage médian de 53,2% au sein des CD4⁺ et de 9,9% au sein des CD8⁺ (Figure 20A). Les cellules T mémoires sont composées en majorité de cellules T_{CM} (CCR7⁺CD45RA^{neg}) au sein des cellules CD4⁺ (médiane= 32,8%) et de cellules T_{TD} (CCR7^{neg}CD45RA⁺) au sein des lymphocytes T CD8⁺ (médiane= 14,5%). Nous retrouvons donc une composition des compartiments T CD4⁺ et CD8⁺ conforme à ce qui a été décrit dans la littérature [4, 12].

Les taux plasmatiques d'IL-7 présentent d'importantes différences inter-individuelles (CV= 64%) (Figure 20B). Il n'existe pas de différence entre les valeurs des sujets de genre masculin et féminin, ni de corrélation avec l'âge des patients. Cette variabilité est moins importante pour l'IL-15 (CV= 23%) (Figure 20C). L'utilisation d'un test ELISA « standard » pour l'IL-15 et non « Ultra Sensible » (non disponible actuellement) a pu gommer une partie de la variabilité dans la mesure où le seuil analytique de détection (2 pg/mL) est proche des valeurs plasmatiques retrouvées.

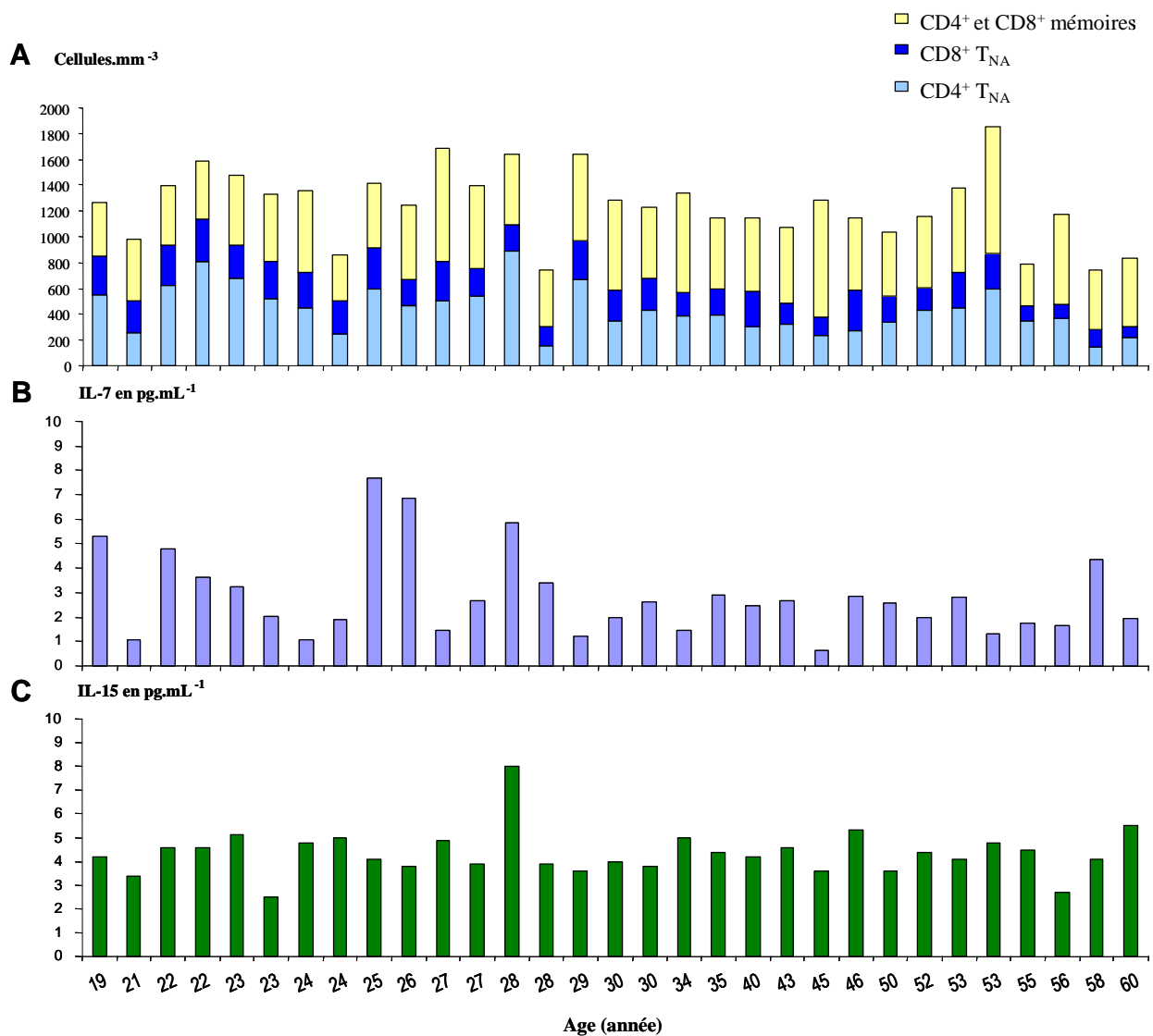


Figure 20 : Hétérogénéité inter-individuelle de la lymphocytose T et des taux plasmatiques des cytokines homéostatiques chez les sujets sains étudiés (A) Contribution des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves à la lymphocytose T CD3⁺ de 31 sujets classés selon leur âge. (B) Taux d'IL-7 plasmatique en fonction de l'âge des sujets (C) Taux d'IL-15 plasmatique en fonction de l'âge des sujets.

Malgré l'absence de corrélation entre les taux plasmatiques de chaque cytokine homéostatique et la lymphocytose T, il existe une concordance globale entre ces trois valeurs (Coefficient de concordance de Kendall (W)= 0,865 ; $P < 0,001$).

Il existe également une bonne concordance entre les valeurs absolues des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves et le taux d'IL-7 plasmatique ($W = 0,94$; $P < 0,001$). Une concordance est également notée entre les valeurs absolues des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves et le taux d'IL-15 plasmatique quoique de significativité inférieure ($W = 0,529$; $P = 0,022$).

De même la taille du compartiment mémoire CD8⁺ concorde globalement avec les taux d'IL-7 et d'IL-15 ($W = 0,946$; $P < 0,001$) avec un degré significativement supérieur au compartiment CD4⁺ mémoire.

2) Expression de l'IL-7R α (CD127) et de l'IL-2/15R β (CD122) à la surface des sous-populations lymphocytaires T

2.1. Hétérogénéité d'expression du CD127 à la surface des sous-populations de cellules T CD8⁺ différenciées

Quelque soit leur degré de différenciation, la quasi-totalité des lymphocytes CD4⁺ exprime le CD127 (Figure 21A). En revanche, le degré d'expression membranaire de ce récepteur, estimé par la médiane de fluorescence, est significativement plus faible sur les cellules CD4⁺T_{NA} que sur les cellules T_{CM} et T_{EM} (Figure 21C).

Au sein des cellules T CD8⁺, les cellules naïves et mémoires centrales sont majoritairement CD127⁺. En revanche, il existe un contingent croissant de cellules de phénotype mémoire n'exprimant pas le CD127, des cellules T_{EM} aux cellules T_{TD}. (Figure 21B). Il s'agit bien d'une absence d'expression du récepteur pour la plupart des cellules et non une simple diminution de densité membranaire comme en témoigne le profil d'expression dépourvu de signal positif sur les cellules mémoires comparées aux cellules naïves (Figure 22). Au sein des cellules CD8⁺T_{TD}, la densité d'expression du CD127 varie beaucoup d'un individu à l'autre (CV=30%) (Figure 21D).

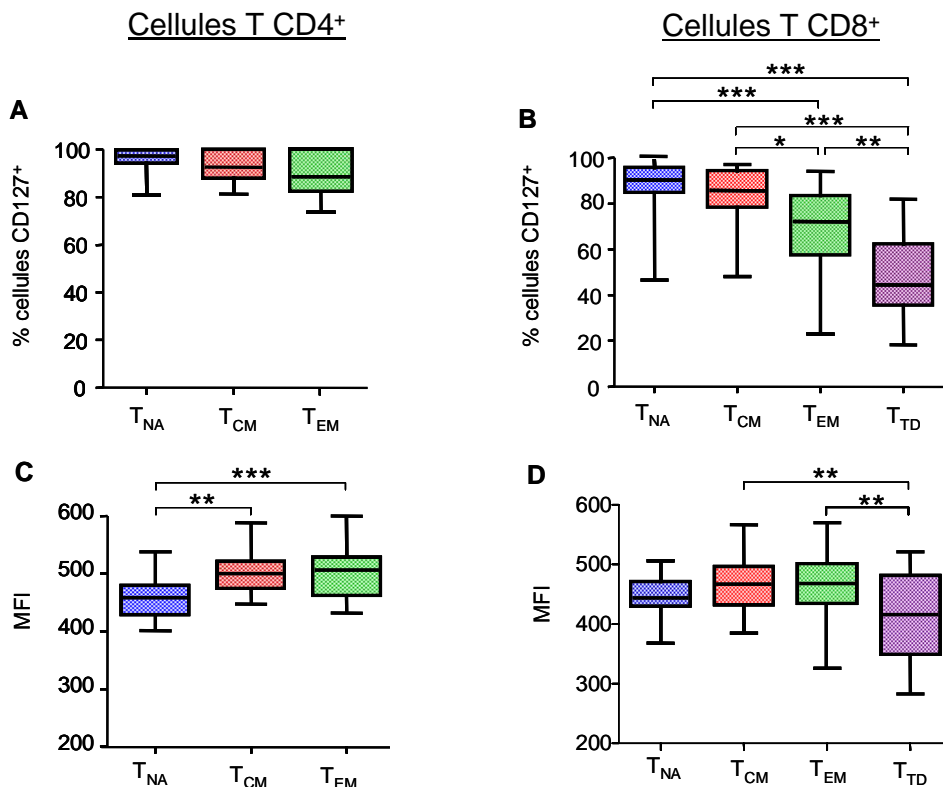


Figure 21 : Expression du CD127 à la surface des sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ (A) Pourcentage de cellules exprimant le CD127 dans chacune des sous-populations T CD4⁺. (B) Pourcentage de cellules exprimant le CD127 dans chacune des sous-populations T CD8^{hi} (Test de Kruskal Wallis ($H = 69,7$; $P < 0,0001$)) (C) Intensité médiane de fluorescence (MFI) sur chacune des sous-populations T CD4⁺ ($H = 19,4$; $P < 0,001$) (D) MFI sur chacune des sous-populations T CD8^{hi} ($H = 15,06$; $P < 0,01$). Les boîtes représentent la médiane encadrée par le 25^{ème} et 75^{ème} percentile. «Les moustaches» correspondent au minimum et au maximum (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ par le post-test de Dunn).

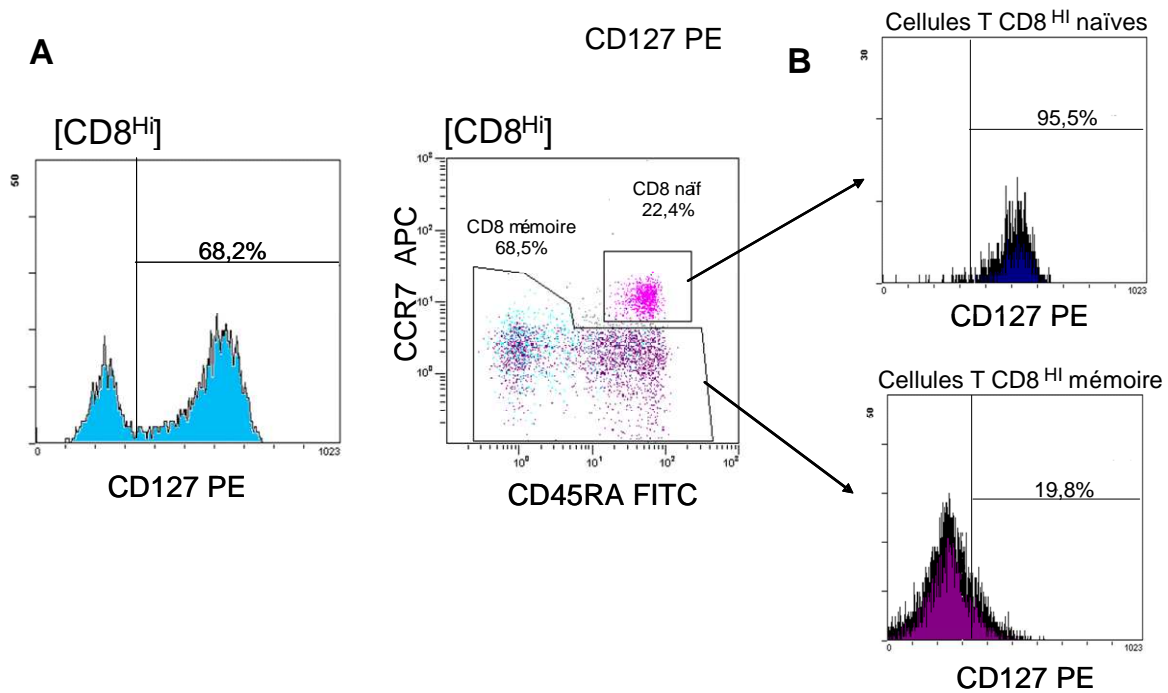


Figure 22 : Identification des cellules T CD8⁺CD127⁺ dans les contingents naïf et mémoire en cytométrie en flux chez un sujet sain représentatif (A) Profil d'expression du CD127 en simple marquage. Histogramme biparamétrique présentant les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoire en fonction de leur expression des marqueurs de différenciation CD45RA et CCR7. (B) Profil d'expression du CD127 par les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoires ciblés (gate). Les curseurs nous renseignent sur le pourcentage de cellules positives. L'axe des abscisses nous informe sur l'intensité moyenne de fluorescence à la membrane.

2.2. Expression membranaire du CD127 par cellules T et taux plasmatiques d'IL-7

Il n'y a pas de corrélation entre le taux d'IL-7 plasmatique et le pourcentage de cellules CD127⁺ (Tableau 4). En revanche, lorsque les taux d'IL-7 sont plus élevés, on observe une densité membranaire du CD127 plus forte sur les sous-populations de cellules T CD8⁺ mémoires centrales, cellules T CD8⁺ effectrices mémoires et de cellules T CD8⁺ de différenciation terminale. La corrélation entre le taux d'IL-7 et la densité d'expression du CD127 sur les cellules T CD4⁺ effectrices mémoires tend à être positive ($P=0,051$).

	4T _{NA}	4T _{CM}	4T _{EM}	8T _{NA}	8T _{CM}	8T _{EM}	8T _{TD}
%CD127							
Spearman R	-0,029	0,011	0,013	0,349	0,007	0,098	0,349
Valeur P	0,877	0,952	0,946	0,054	0,969	0,600	0,054
MFI CD127							
Spearman R	0,148	0,296	0,360	0,352	0,445*	0,481*	0,605*
Valeur P	0,436	0,113	0,051	0,056	0,014	0,007	<0,001

Tableau 4 : Corrélation entre le taux d'IL-7 plasmatiques, le pourcentage de cellules T CD127⁺ ou la densité membranaire du CD127 (MFI) dans les sous-populations de cellules T naïves et mémoires chez les sujets sains. La valeur du P a été calculée par un test de Spearman. Les corrélations significatives sont indiquées par un astérisque.

2.3. Faible proportion de cellules CD122⁺ dans le compartiment T

Contrairement au CD127, l'IL-2/15R β (CD122) n'est détecté que sur une faible proportion des cellules CD4⁺. La comparaison des différentes sous-populations CD4⁺ montre que la proportion d'entre elles exprimant le récepteur augmente avec le degré de différenciation (Figure 23A). En revanche la densité d'expression (MFI) reste identique pour les trois sous-populations (Figure 23C).

Au sein des CD8⁺, seul le contingent CD8⁺T_{TD} comporte une forte proportion de cellules CD122⁺, qui peut dépasser 50%, avec une densité membranaire accrue (Figure 23B et 23D). Pour chaque individu, la proportion de cellules CD122⁺ dans les CD8⁺T_{TD} est supérieure à celle des cellules CD8⁺T_{EM}.

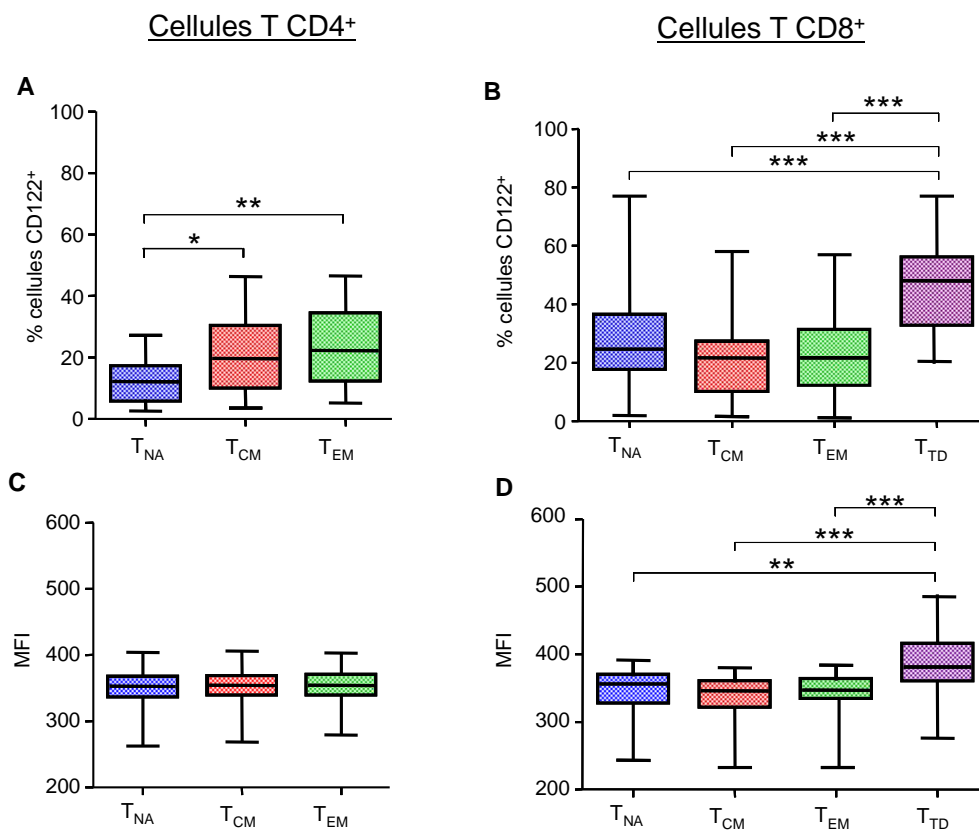


Figure 23 : Expression du CD122 à la surface des sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ (A) Pourcentage de cellules exprimant le CD122 dans chacune des sous-populations T CD4⁺ ($H= 16,5$; $P < 0,001$) (B) Pourcentage de cellules exprimant le CD122 dans chacune des sous-populations T CD8^{hi} ($H= 37,99$; $P < 0,0001$) (C) MFI sur chacune des sous-populations T CD4⁺. (D) MFI sur chacune des sous-populations T CD8^{hi} ($H= 29,59$; $P < 0,0001$) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ par le post-test de Dunn).

Il n'y a pas de corrélation entre l'expression du récepteur, en pourcentage ou MFI, et le taux d'IL-15, pour aucune des sous-populations CD4⁺ et CD8⁺ (Tableau 5).

	4T _{NA}	4T _{CM}	4T _{EM}	8T _{NA}	8T _{CM}	8T _{EM}	8T _{TD}
%CD122							
Spearman R	0,177	-0,009	0,063	-0,091	-0,168	-0,121	-0,189
Valeur P	0,341	0,962	0,738	0,627	0,366	0,517	0,309
MFI CD122							
Spearman R	-0,154	-0,137	-0,160	-0,005	0,094	-0,071	0,034
Valeur P	0,417	0,469	0,399	0,979	0,622	0,710	0,860

Tableau 5 : *Corrélation entre le taux d'IL-15 plasmatique, le pourcentage de cellules T CD122⁺ ou la densité membranaire du CD122 (MFI) dans les sous-populations de cellules T naïves et mémoires chez les sujets sains. La valeur du P a été calculée par un test de Spearman. Aucun coefficient de corrélation n'atteint le seuil de significativité.*

2.4. Corrélation entre l'expression du CD127 et du CD122 sur les lymphocytes T CD8⁺ différenciées CCR7^{neg}

Il existe une corrélation positive entre le nombre de lymphocytes CD8⁺T_{EM} exprimant le CD127 et exprimant le CD122 (R= 0,643 ; P< 0,0001). On retrouve cette même corrélation pour les CD8⁺T_{TD} (R= 0,749 ; P< 0,0001) (Figure 24). Il n'a pas été possible de déterminer le degré d'expression conjointe des deux récepteurs pour une même cellule, car les anticorps correspondants disponibles sont conjugués au même fluorochrome.

Néanmoins, comme l'addition des pourcentages de cellules T CD8^{hi}T_{EM} CD122⁺ et CD127⁺ dépasse 100% chez plusieurs sujets, ceci suggère que la co-expression des récepteurs est possible. Le même constat est trouvé sur les CD8^{hi}T_{TD}. Il n'existe pas de corrélation entre le pourcentage de cellules CD122⁺ et CD127^{neg} (R= 0,066 pour les CD8^{hi}T_{EM} ; R= 0,133 pour les CD8^{hi}T_{TD})

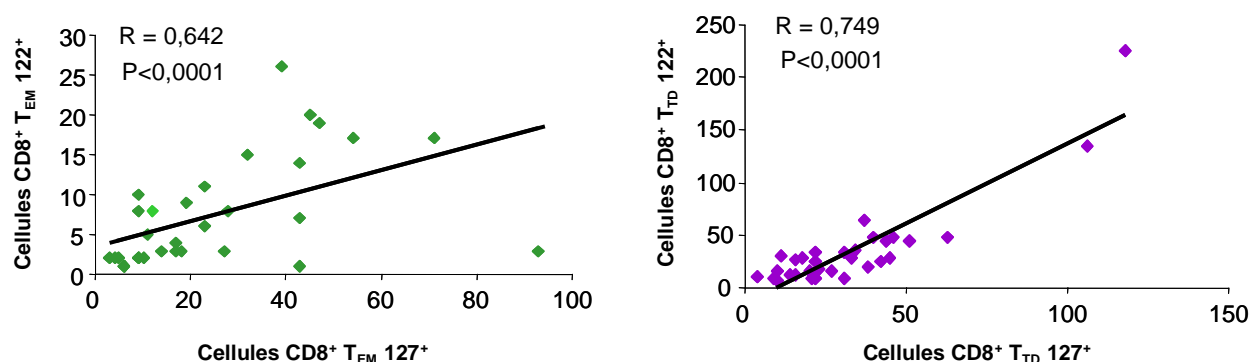


Figure 24 : *Corrélation entre les valeurs absolues des cellules T CD8^{hi}T_{EM} et T_{TD} exprimant le CD122 et/ou le CD127. La valeur absolue est exprimée en nombre de cellules/mm³. Les droites de régression sont représentées. La corrélation des expressions par les CD8⁺T_{TD} reste encore significative (R= 0,693 ; P< 0,0001) si on écarte les deux valeurs extrêmes.*

3) Discussion et conclusion

Le préalable à notre travail était d'évaluer, chez l'Homme, le taux circulant des cytokines homéostatiques majeures et l'expression de leur récepteur en situation basale. L'étude de 31 sujets adultes sains, en situation immunologique stable (comme en atteste l'absence d'expression du HLA-DR et les taux infimes d'IL-2R soluble) confirme la grande variabilité interindividuelle de leur lymphocytose T CD3⁺ et révèle que cette variabilité est essentiellement corrélée à la taille de leur compartiment naïf T CD4⁺ et T CD8⁺. Chez un adulte, ces lymphocytes T naïfs dérivent de nouveaux émigrants thymiques, dont la proportion reste relativement stable chez l'adulte, et surtout de la prolifération homéostatique basale assurant le renouvellement régulier des cellules T naïves [421].

La variabilité de la lymphocytose T s'accompagne d'une variabilité inter-individuelle des taux plasmatiques d'IL-7. Les variations de ces deux paramètres, observées en situation physiologique ne sont pas directement corrélées, en accord avec une étude récente [422]. La variabilité de l'IL-7 pourrait être en partie liée à un polymorphisme du promoteur de ce gène [423] ou à un polymorphisme d'épissage [103]. Bien qu'il n'existe pas de corrélation entre les couples de valeurs individuelles, l'étude de concordance montre que la numération des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves et le taux d'IL-7 plasmatique concordent globalement. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné l'importance de l'IL-7 dans le maintien du compartiment naïf [91].

Les taux d'IL-15 plasmatiques sont comparables à ceux rapportés dans la littérature [424]. Toutefois, ces taux ne permettent pas d'apprécier la réelle production de cette cytokine, avant tout complexée à l'IL-15R α membranaire ou son isoforme circulant [425]. Pour mieux apprécier la production d'IL-15, nous aurions pu utiliser un anticorps anti-IL-15 pour détecter la cytokine à la surface des cellules productrices ou transprédatrices. Cependant, cette option n'a pas été retenue puisque la transprédatrice de l'IL-15 se fait essentiellement au niveau tissulaire [156]. La concordance entre les taux d'IL-15 et le contingent de cellules T CD8⁺ mémoires conforte le rôle, déjà décrit, de cette cytokine dans le maintien du compartiment T CD8 mémoire [126, 189].

Parallèlement à l'évaluation des principales cytokines homéostatiques, notre étude a permis de déterminer pour chaque sujet sain l'expression membranaire de l'IL-7R α et de l'IL-2/15R β sur chacune des sous-populations T CD4⁺ et T CD8⁺, naïves et mémoires.

L'étude de l'expression membranaire de l'IL-7R α montre la présence de cette chaîne sur la quasi-totalité des cellules T naïves, CD4 comme CD8, avec une densité d'expression similaire, quelque soit la lymphocytose T naïve ou le taux d'IL-7 plasmatique. Ceci est à rapprocher de l'expression rapportée sur les émigrants thymiques récents [426] et les cellules T de sang de cordon [214]. Toutefois, un petit contingent de cellules T CD8⁺ naïves demeure CD127^{neg} en accord avec la caractérisation récente de ce contingent minoritaire [105].

Au sein des cellules T CD4⁺ mémoires, nous détectons la présence du CD127 sur la quasi-totalité d'entre elles avec une densité membranaire accrue comparativement aux cellules naïves. Plusieurs études décrivent un phénomène de régulation négative transitoire du CD127 sur les cellules CD4⁺ naïves suite à une activation par engagement du TCR [141, 235]. Le CD127 est par la suite ré-exprimé sur les cellules mémoires [142]: 80% de cellules CD4⁺T_{CM} sont positives pour le CD127 conformément à ce qui a été décrit par Stubbe [427]. Nos résultats concordent également avec ce qui a été décrit chez la souris [91]. Ils s'opposent en revanche à ce qui a été suggéré dans certains modèles de différenciation des cellules humaines [428], sans que les articles correspondant ne présentent de données détaillées. Les rares cellules CD4⁺CD127^{neg} retrouvées chez certains de nos sujets sains pourraient correspondre à des cellules T régulatrices qui pourraient représenter jusqu'à 6% des cellules CD4⁺ totales [106].

Au sein des cellules T CD8⁺ mémoires, nous observons une expression forte et homogène du CD127 sur la quasi-totalité des cellules T CD8⁺ mémoires centrales, comparable à celle des cellules T CD8 naïves [429]. En revanche, cette expression est absente à la surface de 30% des cellules T CD8⁺ mémoires effectrices et plus de 50% des cellules de différenciation terminale sont CD127^{neg}. D'après nos analyses, il s'agit bien d'une absence, et non pas seulement d'une faible expression de ce récepteur, comme l'interprète l'équipe de Kim, en contradiction avec les histogrammes de fluorescence présentés dans leur article [430]. L'existence d'un contingent de cellules CD8⁺T_{EM} CD127^{neg} concorde avec la mise en évidence récente de deux composantes principales (T_{EM} 1 et 3) au sein de cette sous-population, qui transcrivent de manière différente le gène de l'IL-7R α [431]. Par ailleurs, la proportion de cellules CD8⁺T_{TD} CD127⁺, ainsi que la densité d'expression membranaire de cette molécule, varient beaucoup d'un individu à l'autre. Ceci n'est pas pour nous surprendre étant donné l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle de la sous-population CD8⁺T_{TD} [428, 432]. Cette perte d'expression du CD127, rapportée à une méthylation irréversible du gène [433], suggère l'indépendance des cellules T CD8⁺ les plus différenciées vis-à-vis de l'IL-7 pour leur survie, contrairement aux cellules T CD8⁺ naïves et mémoires centrales. Comme d'autres [432], nous n'observons pas de corrélation entre l'expression du CD127 et le taux plasmatique d'IL-7.

Notre étude de l'expression membranaire de l'IL-2/15R β révèle un faible contingent de cellules T CD122⁺. Plusieurs équipes ont étudié chez l'Homme l'expression de ce récepteur avec des résultats discordants. Dans tous les cas, il s'agissait d'études réalisées après isolement des cellules mononucléées et non sur sang total, portant sur quelques sujets et ne rapportant que rarement des données chiffrées en pourcentage et/ ou en médiane de fluorescence.

Dans une étude réalisée sur des lymphocytes T CD4⁺ en conditions basales mises en culture, Géginat et coll. observent une expression faible sur les cellules naïves, qui augmente sur les mémoires centrales en pourcentage et en intensité, et plus encore sur les effecteurs mémoires [186]. Si nous retrouvons effectivement ce profil d'expression sur les différentes sous-populations T CD4⁺, ainsi que sur

les CD8⁺, la proportion de cellules positives que nous avons observée est beaucoup plus faible, mais comparable à celle retrouvée par d'autres auteurs [434, 435].

L'analyse de l'expression du CD122 sur les lymphocytes T CD8⁺ rapportée dans la littérature est encore plus délicate à interpréter. La plupart des études qui rapportent une proportion élevée de cellules CD8⁺CD122⁺ ont considéré la totalité des cellules CD8⁺ [185, 430], sans tenir compte du contingent de cellules NK (CD3^{neg}) exprimant la molécule CD8 avec une intensité faible. Or, les cellules NK expriment fortement le CD122, beaucoup plus que les authentiques cellules T [436]. Nous nous sommes attachés à évaluer l'expression du CD122 sur le seul contingent CD8^{hi}, pour analyser exclusivement les cellules T CD8⁺. Ceci peut expliquer le nombre plus faible de cellules T (CD8^{hi}) que nous détectons positives pour le CD122, qui reste cependant en accord avec d'autres études [435, 436]. La complexité de l'analyse d'expression du CD122 est renforcée par la capacité qu'ont les cellules T CD8⁺ T_{TD} (sous-population exprimant le plus le CD122) à exprimer également des marqueurs de type NK. A cet égard, plusieurs travaux centrés sur l'étude des cellules T exprimant des marqueurs de type NK (CD56 principalement) ont montré une expression plus forte du CD122 sur les cellules T CD56⁺ [436, 437].

Dans nos conditions d'analyse, nous détectons une proportion accrue de cellules CD122⁺ au sein des lymphocytes T CD8⁺ les plus différenciés. Ce résultat est conforme aux données de la littérature montrant une augmentation de l'expression de la protéine [126] ou de la transcription du gène [438] dans ces cellules différenciées. Cette acquisition s'accompagne d'une diminution de la proportion des cellules CD127⁺ dans cette même sous-population. Pour des raisons techniques, nous n'avons pu étudier la co-expression du CD127 et du CD122 à la surface des cellules T CD8⁺ différenciées. La comparaison des figures 22 et 23, représentant l'expression du CD122 et du CD127 suggère une évolution antithétique de l'expression de ces deux récepteurs au cours de la différenciation des cellules T CD8⁺. Cette hypothèse est évoquée par Kim et al, mais rappelons que leur protocole d'analyse, qui n'exclut pas les cellules NK (majoritairement CD127^{neg}) ne permet pas d'étayer leurs conclusions [430]. Nous ne retrouvons pas de corrélation entre les pourcentages de cellules CD122⁺ et CD127^{neg} et d'autre part, l'addition des pourcentages CD122⁺ et CD127⁺ suggère une co-expression des deux récepteurs de cytokines sur une fraction des cellules T_{EM} et T_{TD}. La corrélation observée dans notre étude entre les valeurs absolues des cellules CD8⁺ différenciées CD122⁺ et CD127⁺ (Figure 24) permet d'émettre l'hypothèse d'une régulation coordonnée des deux récepteurs sur les cellules très différenciées. Ceci devra être vérifié, à la fois par l'analyse de la co-expression de ces deux récepteurs en cytométrie en flux (si les réactifs adéquats peuvent être utilisés), et, par l'étude de la cinétique d'expression de ces deux molécules à la surface des cellules T CD8⁺ lors d'un processus de différenciation induit en culture [439].

Contrairement aux cellules T CD8⁺, l'acquisition de l'IL-2/15R β au cours du processus de différenciation ne semble pas ou peu concerner les cellules T CD4⁺. Ceci peut être expliqué par le fait que le processus de différenciation des cellules T CD4⁺ ne conduit qu'exceptionnellement à l'acquisition d'un phénotype de différenciation terminale.

Si l'analyse de l'IL-2/15R β donne des résultats discordants dans la littérature, la controverse est encore plus manifeste en ce qui concerne l'IL-15R α . L'expression de l'IL-15R α , est quasi-indélectable quelque soit le protocole expérimental testé dans notre laboratoire. Ce même constat est rapporté par plusieurs équipes [185, 186].

Au total, notre analyse de l'expression membranaire de l'IL-7R α et de l'IL-2/15R β en pourcentage et en médiane de fluorescence sur chacune des sous-populations T CD4 $^+$ et T CD8 $^+$ confirme et suggère plus avant les similitudes d'exigences de survie des cellules T CD4 $^+$ et CD8 $^+$ naïves et les différences d'exigences de survie des cellules T CD4 $^+$ et CD8 $^+$ différenciées. La présence du CD127 mais la quasi-absence du CD122 sur la quasi-totalité des cellules T CD4 $^+$ et CD8 $^+$ naïves humaines en situation d'homéostasie suggère une dépendance majeure de ces cellules vis-à-vis de l'IL-7 chez l'Homme, comme ceci a été établi dans les modèles expérimentaux murins. Cette dépendance vis-à-vis de l'IL-7 reste sans doute prépondérante pour les lymphocytes T CD4 $^+$ différenciés, dont la densité membranaire d'IL-7R α s'accroît, tandis que seul 1/5 de ces cellules possède l'IL-2/15R β à sa membrane. Pour les cellules T CD8 $^+$, la dépendance vis-à-vis de l'IL-7 diminue apparemment au profit de l'IL-15 lors de leur différenciation puisque certaines d'entre elles deviennent CD127 négatives. L'IL-15 est en effet capable, chez l'Homme, d'induire une résistance des cellules CD8 $^+$ T_{EM} et T_{TD} à l'apoptose post-activation [440], tandis que la réponse des cellules mémoires à l'IL-7 est bien plus faible que celle des cellules CD4 $^+$ [441].

Les données acquises chez les sujets adultes sains étaient essentielles pour aborder la deuxième partie de notre travail : l'évaluation chez l'Homme de l'implication des cytokines homéostatiques, IL-7 et IL-15, dans une situation de lymphopénie sévère telle qu'elle est déclenchée par le conditionnement des receveurs de cellules souches hématopoïétiques.

Partie 2 : Impact de la variation des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 sur le devenir de l'allogreffe de moelle osseuse et la repopulation du CLTP après conditionnement myéloablatif.

1) Données publiées

Article accepté en Décembre 2009 dans Bone Marrow Transplantation

Bone Marrow Transplantation (2010), 1–7
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0268-3369/10 \$32.00
www.nature.com/bmt

ORIGINAL ARTICLE

Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse

S Thiant^{1,2,3}, I Yakoub-Agha^{1,2,4}, L Magro⁴, J Trauet³, V Coiteux⁴, J-P Jouet^{1,2,4}, J-P Dessaint^{1,2,3} and M Labalette^{1,2,3}

¹Université Lille Nord de France, Lille, France; ²Laboratoire d'Immunologie, UDSL, Lille, France; ³Service d'Immunologie, CHRU de Lille, Lille, France and ⁴Service des Maladies du Sang, CHRU de Lille, Lille, France

2) Données complémentaires

- IL-7, facteur prédictif de la GVH aiguë : spécificité et sensibilité du taux d'IL-7 à J+14 post-greffe

Le taux plasmatique d'IL-7 à J+14 apparaît comme le facteur prédictif de la GVH aiguë le plus significatif chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif. A la valeur médiane retenue à J+14 égale à 11,9 pg/mL, la spécificité de ce marqueur biologique pour prédire la GVH aiguë de grade 2-4 est de 71,4% et la sensibilité du test est de 80%. Nous avons cherché à optimiser la spécificité et la sensibilité de cette valeur seuil par la réalisation d'une courbe «Receiver operating characteristics » (ROC) (Figure 25A).

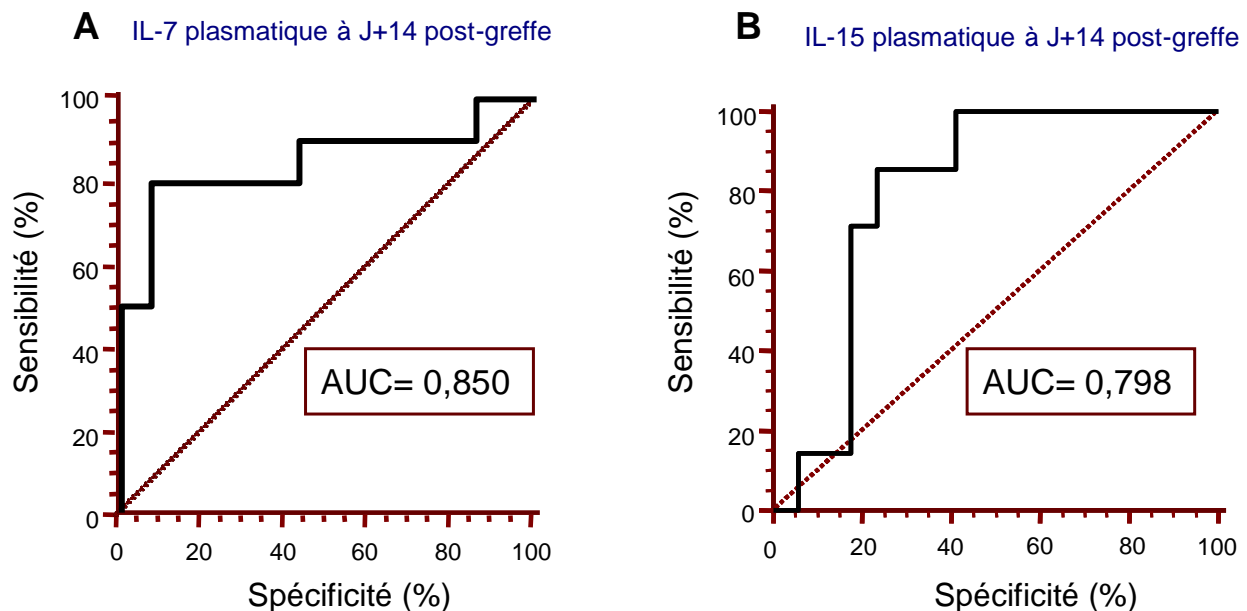


Figure 25 : *Courbe ROC des taux plasmatiques des cytokines homéostatiques à J+14. (A) Spécificité et sensibilité du taux plasmatique d'IL-7 à J+14 comme facteur prédictif de la GVH aiguë. (B) Spécificité et sensibilité du taux plasmatique d'IL-15 à J+14 comme facteur prédictif de la rechute chez les patients recevant un conditionnement myéloablatif. Les aires sous la courbe (AUC) sont indiquées sur chaque graphique.*

D'après la courbe ROC, la valeur médiane d'IL-7 la plus discriminante est de 13,9 pg/mL, ce qui correspond à une valeur intermédiaire entre la médiane des taux d'IL-7 de tous les patients et celle des patients qui vont développer une maladie aiguë du greffon contre l'hôte. Avec cette nouvelle valeur, la sensibilité reste inchangée à 80% (intervalle de confiance 95%: 44,4 - 97,5) mais la spécificité du test est accrue à 92,9% (intervalle de confiance 95%: 66,1 - 99,8). La fréquence des GVH aiguës observées (19/40 patients) autorise à utiliser l'intervalle de Wald pour estimer l'intervalle de confiance sans risque d'introduire de biais majeur.

La sensibilité du test n'atteignant pas la valeur de 100%, d'autres facteurs sont à considérer dans la survenue de la GVH aiguë ; ils seront discutés ultérieurement. L'excellente spécificité souligne la valeur pronostique rassurante d'un pic systémique d'IL-7 relativement faible deux semaines avant le temps médian de survenue de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë dans cette cohorte de 40 patients.

- IL-15, facteur prédictif de la rechute : spécificité et sensibilité du taux d'IL-15 à J+14 post-greffe

Le facteur le plus prédictif de la rechute chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif apparaît comme étant le taux plasmatique d'IL-15 à J+14. A la valeur médiane retenue à J+14 de 33,3 pg/mL, la spécificité de ce marqueur biologique pour prédire la rechute est de 61,3% et la sensibilité du test est de 85,7% (Figure 25B).

D'après la courbe ROC, la valeur médiane d'IL-15 la plus prédictive est de 23 pg/mL pour laquelle la spécificité du test est de 76,47% (intervalle de confiance 95%: 50,1 - 93,2) et la sensibilité de 85,71% (intervalle de confiance 95%: 42,1 - 99,6).

- Relation entre les taux circulants de cytokines homéostatiques et l'expression de l'IL-7R α et IL-2/15R β

A partir de J+30, les receveurs recevant un conditionnement myéloablatif sortent progressivement de la phase de lymphopénie sévère et la numération lymphocytaire permet alors d'analyser l'expression du CD127 et du CD122 sur les populations CD4⁺ et CD8⁺, naïves et mémoires.

Nous constatons que la densité membranaire de l'IL-7R α sur toutes les cellules T est inversement corrélée au taux d'IL-7 plasmatique (Tableau 6). Plus les taux sont élevés, plus le récepteur est réprimé à la membrane, ce qui a déjà été décrit dans la littérature et peut être attribué à l'effet répresseur de l'IL-7 sur l'expression de la chaîne spécifique de son récepteur, mais peut être aussi la conséquence de l'activation cellulaire T [429, 442]. En revanche, les taux plasmatiques d'IL-15 n'ont pas d'influence significative sur l'expression de l'IL-2/15R β (résultats non illustrés).

Population T CD4 ⁺ CD127 ⁺	Valeur du R de Spearman	Valeur de P	Population T CD8 ⁺ CD127 ⁺	Valeur du R de Spearman	Valeur de P
CD4 T _{NA}	- 0,422	0,004	CD8 T _{NA}	- 0,335	0,025
CD4 T _{CM}	- 0,481	0,001	CD8 T _{CM}	- 0,457	0,002
CD4 T _{EM}	- 0,383	0,009	CD8 T _{EM}	- 0,339	0,023
			CD8 T _{TD}	- 0,397	0,007

Tableau 6 : Corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-7 à J+30 chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif et la densité membranaire (MFI) du CD127/IL-7R α à la surface des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺.

Partie 3 : Impact de la variation des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15 sur le devenir de l'allogreffe de CSH et la repopulation du CLTP après conditionnement d'intensité réduite

1) Données publiées

Article accepté en Décembre 2010 dans Bone Marrow Tansplantation

Bone Marrow Transplantation (2010), 1–8
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0268-3369/10
www.nature.com/bmt

ORIGINAL ARTICLE

Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD

S Thiant^{1,2}, M Labalette^{1,2,3}, J Trauet³, V Coiteux⁴, E de Berranger⁴, J-P Dessaint^{1,2,3}
and I Yakoub-Agha^{1,2,4}

¹Université Lille Nord de France, Lille, France; ²UDSL, Faculté de Médecine, Laboratoire d'Immunologie, IFR114, Lille, France; ³CHU Lille, Service d'Immunologie, Lille, France and ⁴CHU Lille, Service des Maladies du Sang, Lille, France

2) Données complémentaires

- IL-7, facteur prédictif de la GVH aiguë : spécificité et sensibilité du taux d'IL-7 à J+30

Le taux plasmatique d'IL-7 à J+30 apparaît comme le facteur prédictif de la GVH aiguë le plus significatif chez les patients ayant reçu un conditionnement d'intensité réduite. Nous avons évalué la spécificité et la sensibilité de cette concentration plasmatique par la réalisation d'une courbe ROC (Figure 26). La valeur médiane d'IL-7 que nous avons retenue à J+30 pour les 45 receveurs est de 5,9 pg/mL. Elle correspond à la valeur la plus discriminante estimée par la courbe ROC. La spécificité pour prédire la GVH aiguë de grade 2-4 est de 69,2% (intervalle de confiance 95%: 48,2 - 85,7) et la sensibilité de 75% (intervalle de confiance 95%: 47,6 - 92,7).

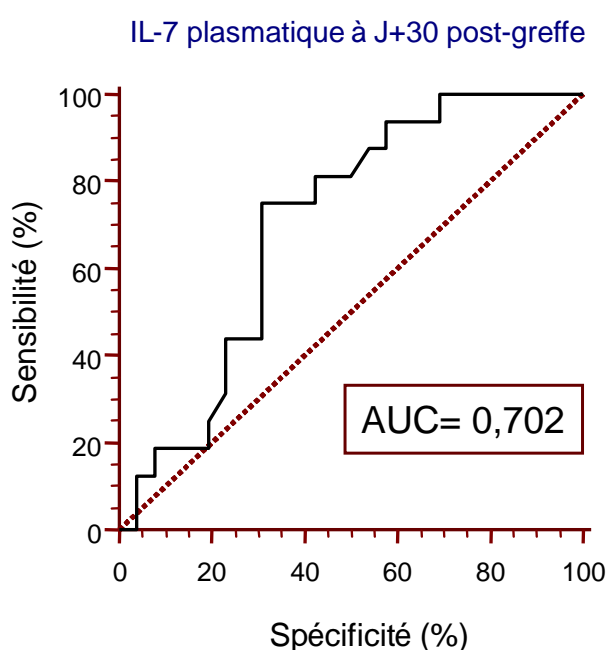


Figure 26 : Courbe ROC des taux plasmatiques d'IL-7 à J+30. Spécificité et sensibilité du taux plasmatique d'IL-7 à J+30 comme facteur prédictif de la GVH aiguë chez les patients recevant un conditionnement réduit. L'aire sous la courbe (AUC) est indiquée sur le graphique.

- Hétérogénéité des conditionnements d'intensité réduite et leur retentissement en termes de taux de cytokines homéostatiques

Du point de vue du traitement préparatif, notre cohorte de patients ayant reçu un conditionnement d'intensité réduite (RIC) est moins homogène que notre cohorte de patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif car les protocoles de conditionnements réduits sont nombreux et hétérogènes en termes d'effet hypoplasiant [287, 378]. Nous les avons donc classifiés les conditionnements en fonction de leur pouvoir lymphopéniant, représenté ci-dessous d'après un schéma proposé par Dhédin [443].

Selon cette classification, parmi les protocoles utilisés pour les patients de notre cohorte, le conditionnement « Seattle » à base de fludarabine et d'irradiation corporelle totale (ICT) 2 Gy est le moins lymphopéniant, même si les effets de la fludarabine sur la lymphocytose sont loin d'être négligeables [444].

En revanche les 3 autres protocoles (MIDI, KOLB et SLAVIN) se situent dans un niveau d'intensité sensiblement identique. Les conditionnements utilisant de forte dose de melphalan ont déjà été décrits comme responsables de niveaux de lymphopénie proches de ceux retrouvés dans le conditionnement myéloablatif [445].

Nous avons donc choisi d'analyser plus finement les taux d'IL-7, d'IL-15 et la CRP en regroupant ces 3 protocoles (« RIC 2 ») et en les comparant au conditionnement « Seattle » (« RIC 1 »).

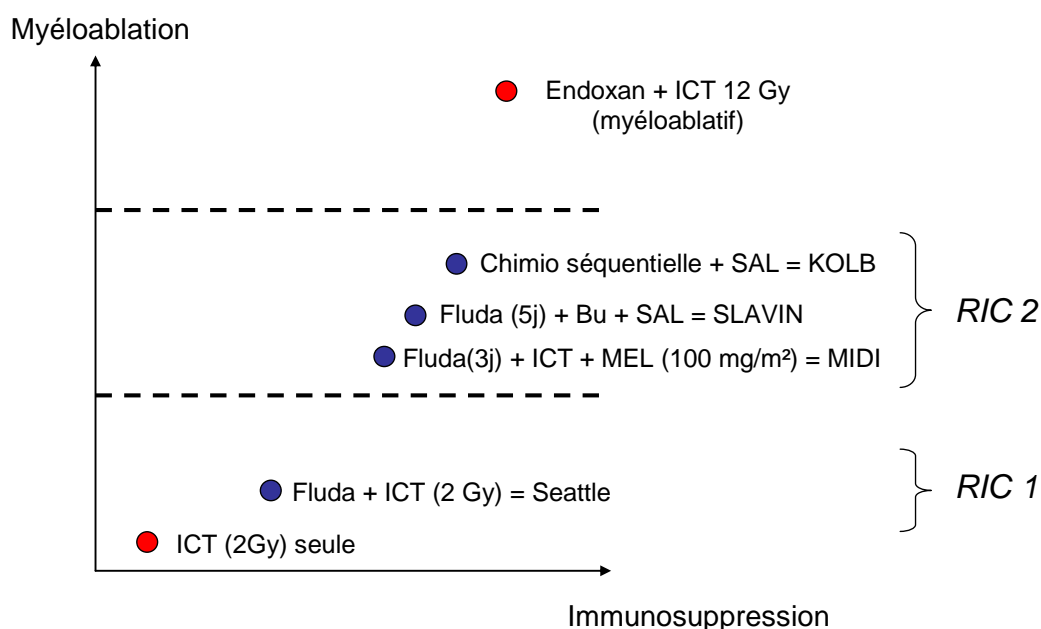


Figure 27 : Les différents conditionnements réduits utilisés dans la cohorte étudiée. Ce graphique présente le degré d'immunosuppression et de myéloablation dans les conditionnements réduits reçus par les patients étudiés. Le conditionnement Endoxan+ICT 12Gy considéré comme le conditionnement le plus intense et le conditionnement ICT 2Gy seul considéré comme non myéloablatif sont représentés en rouge à titre comparatif (ICT= irradiation corporelle totale, Gy=Gray, BU= busulfan, SAL= sérum anti-lymphocytaire, Fluda= fludarabine, MEL= melphalan).

Selon cette classification, la numération des cellules T CD3⁺ à J+30 est effectivement plus faible chez les patients ayant reçu un conditionnement de plus forte intensité (« RIC 2 »), mais cette différence se rectifie après trois mois de greffe où la différence n'est alors plus significative ($P=0,054$). Les taux au pic d'IL-7, d'IL-15 et de CRP sont significativement plus élevés dans les conditionnements atténués plus lymphopéniants que dans le protocole « Seattle ».

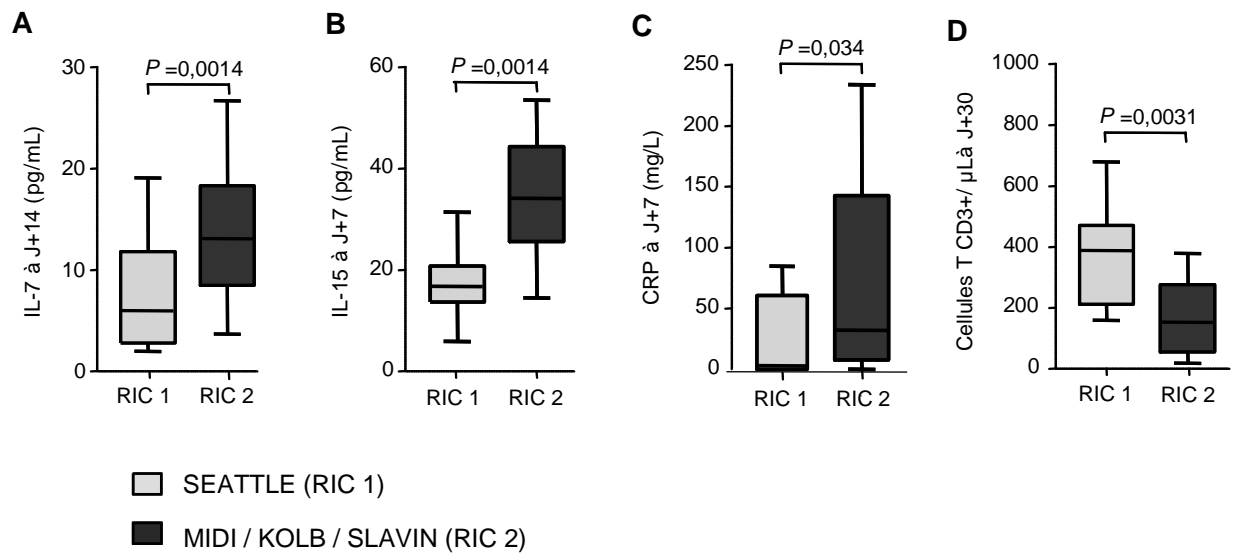


Figure 28 : *Comparaison des taux de cytokines homéostatiques, de CRP et de la numération des lymphocytes CD3⁺ selon l'intensité des conditionnements atténués classifiés en deux catégories. (A) Le taux d'IL-7 est présenté au pic à J+14. (B) Le taux d'IL-15 est présenté au pic à J+7. (C) Le taux de CRP est présenté au pic à J+7. (D) La numération des cellules T CD3⁺ est présentée à J+30. Les boîtes représentent la médiane encadrée par le 25^{ème} et 75^{ème} percentile. Les «moustaches» correspondent au minimum et au maximum. La valeur de P a été calculée par un test de Mann-Whitney.*

Partie 4 : Analyse comparative des taux d'IL-7 et d'IL-15, du contexte inflammatoire et de la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte aiguë en fonction de l'intensité du conditionnement

Considérant que les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif ou atténué étaient très lymphopéniques durant les premières semaines, même après le protocole « Seattle », que les taux systémiques d'IL-7 et d'IL-15 évoluaient en miroir de la lymphocytose T, et que quelque soit le conditionnement pré-greffe les valeurs au pic des taux d'IL-7 plasmatique étaient associées à la survenue ultérieure d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë, nous avons analysé globalement les 107 receveurs d'allogreffe qui ont été suivis prospectivement.

Ce regroupement nous a permis d'analyser comparativement l'évolution de la lymphocytose, des taux d'IL-7 et d'IL-15, l'expression de leurs récepteurs, le degré d'inflammation reflétée par le taux de protéine C réactive et la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë.

Les caractéristiques de ces 107 patients sont reprises dans le Tableau 7 ci-après. Dans cet ensemble de receveurs d'allogreffes HLA-compatibles, 62 patients ont reçu un conditionnement myéloablatif et 45 un conditionnement réduit.

Tableau 7 Patient and graft characteristics, all patients, N = 107

<i>Characteristics</i>	<i>Values</i>
Age at transplantation, median (range), years	
Recipients ¹	49 (7-65)
Donors	40 (1-68)
Male/Female recipients	
Sex-mismatched male recipients, No. (%)	27 (25,3%)
Disease, no. of patients (%)	
AML	38 (35,6%)
ALL	25 (23,3%)
Non-Hodgkin lymphoma	16 (15%)
Myelodysplastic syndrome	10 (9,3%)
Myeloproliferative syndrome	10 (9,3%)
Myeloma	8 (7,5%)
Disease status at transplantation	
Responsive disease - complete response, No. (%)	67 (62,6%)
Pre-conditioning homeostatic cytokine levels²	
Plasma IL-7, median (range), pg/mL	2,3 (0,3-13,3)
Conditioning regimen, No. of patients (%)	
<u>Myeloablative</u>	
CY plus Busulfan	30 (28%)
CY plus TBI (12 Grays)	29 (27,1%)
CY plus Busulfan plus anti-lymphocyte serum	2 (1,9%)
CY plus anti-lymphocyte serum	1 (0,95%)
<u>Reduced intensity, RIC 2</u>	
MIDI	17 (15,9%)
Fluda plus Busulfan plus anti-lymphocyte serum	5 (4,7%)
KOLB	4 (3,7%)
Flag-IDA	1 (0,95%)
<u>Reduced intensity, RIC 1</u>	
Fluda-TBI (2 Grays)	18 (16,8%)
Transplant type, No of patients (%)	
Unmanipulated bone marrow	84 (78,5%)
Sibling donor, 10 of 10 HLA-identical	60 (56%)
Unrelated donor, 10 of 10 HLA-matched	47 (44%)
Total cell doses infused, median (range)	
CD34 ⁺ cells x10 ⁶ /kg recipient weight	3,6 (0,05-284,4)
Total nucleated cells x10 ⁸ /kg recipient weight	3,6 (0,9-363)
GVHD prophylaxis	
CsA and MTX, No. of patients (%)	107 (100%)
Acute GVHD II/IV	
No. of patients (%)	40 (37,4%)
Time of occurrence, median (range), days post-graft	33,5 (14-83)
Relapse of original malignancy	
No. of patients (%)	26 (24,3%)
Time of occurrence, median (range), days post-graft	133 (57-511)
Follow-up, median (range), days post-graft	390 (90-1048)

¹ Including 10 patients who received transplants before the age of 18 years.

² Normal values: IL-7, median 2 pg/mL (range: 0.6-7.7)

1) Variations de la lymphocytose et de la composition du compartiment lymphocytaire T depuis le conditionnement pré-greffe jusqu'à J+90 post-greffe

1.1. Evolution de la lymphocytose T

Les traitements myéloablatifs sont décrits comme plus lymphopéniants que les conditionnements atténués. Nous observons que la médiane du nombre de cellules T circulantes est égale à zéro entre J0 et J+14 pour tous les patients ayant reçu un conditionnement standard, soit au moins 15 jours de lymphopénie T sévère. A partir de J+18, les taux de lymphocytes remontent lentement pour atteindre 500 cellules T/mm³ à J+30 (étendue : 0–2100) (Figure 29A).

La lymphopénie est plus transitoire dans le cas d'un conditionnement réduit. A J0, 17 patients ayant reçu ce type de conditionnement présentent une lymphocytose supérieure à 100 cellules/mm³ et 11 patients une lymphocytose supérieure à 200 cellules/mm³ (médiane= 0 ; étendue 0-1900 CD3⁺/mm³). A J+7, les receveurs sont encore très lymphopéniques puis les numérations remontent. A J+30, ceux-ci présentent une lymphocytose médiane à 500 cellules/mm³ (étendue: 100-6000) analogue aux receveurs ayant eu un conditionnement myéloablatif (Figure 29B).

C'est au cours du deuxième mois post-greffe que les conditionnements se différencient réellement en termes de reconstitution. Les patients ayant reçu un conditionnement réduit montrent une meilleure reconstitution quantitative avec des receveurs retrouvant des valeurs de lymphocytose proche de la normale: 44% des patients présentent une lymphocytose supérieure à 700 cellules T/mm³, contre 18,5 % dans les conditionnements myéloablatifs ; 31,1% ont une lymphocytose supérieure à 1000 cellules T/mm³ contre 15,4% dans les conditionnements myéloablatifs.

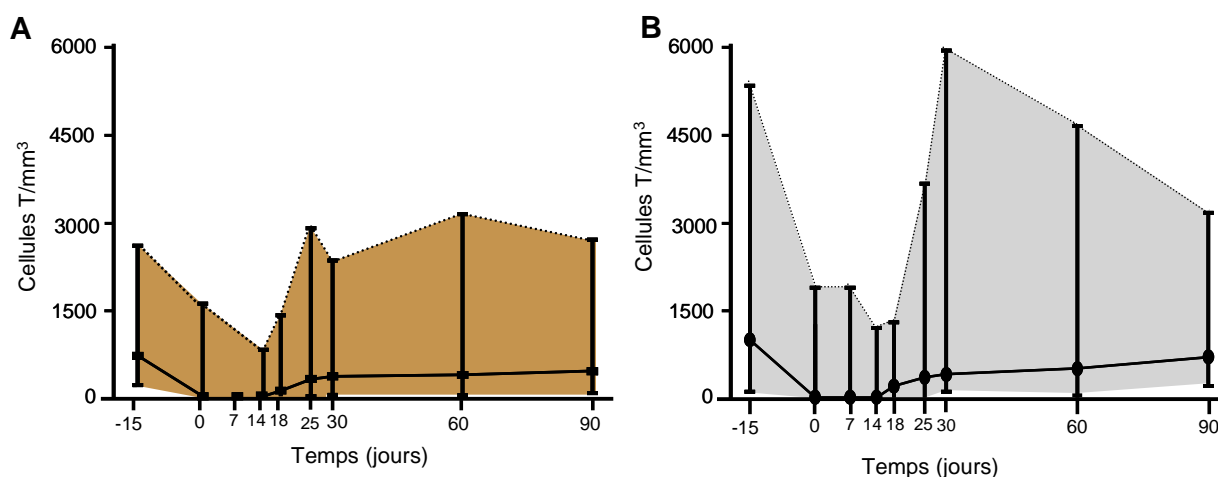


Figure 29 : Nombre médian de cellules T circulantes depuis le conditionnement jusqu'au troisième mois post allogreffe de CSH. (A) Nombre médian de cellules T chez des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif. (B) Nombre médian de cellules T chez des patients ayant reçu un conditionnement réduit. Les barres d'erreur représentent le minimum et le maximum. L'abscisse représente le temps en jours depuis la greffe (J0).

1.2. Rapport CD4/CD8 à J+30 post-greffe en fonction du conditionnement

Rappelons que nous n'avons pris en compte pour définir la population lymphocytaire T CD8 que les cellules qui expriment fortement ce marqueur afin d'éviter d'inclure des cellules NK, d'autant plus que la reconstitution des cellules NK après allogreffe de CSH est rapide.

En analysant les rapports CD4/CD8^{forte expression}, on constate que le rapport normal à 2,1 selon les normes de notre laboratoire chez les sujets sains est diminué chez tous les receveurs. La médiane du rapport CD4/CD8 un mois après la greffe est de 0,73 pour les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif. L'inversion du rapport perdure largement, puisqu'il est égal à 0,53 six mois après le greffe (Tableau 8). A J+30, le rapport n'est pas inversé chez la plupart des patients ayant reçu un conditionnement réduit avec une médiane de 1,04, mais il s'inverse à partir de J+60, où il est égal à 0,67 et l'inversion se poursuit au-delà de six mois post-greffe (Tableau 8).

Rapport CD4/CD8hi	J+30	J+60	J+90	J+180
Conditionnement MA	0,73	0,63	0,54	0,53
Conditionnement RIC	1,04	0,67	0,47	0,51

Tableau 8 : Rapports CD4⁺/CD8^{HI} à J+30, J+60, J+90 et J+180 chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (MA) ou réduit (RIC).

Il n'y a pas de différence significative de pourcentage de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ rapporté à l'ensemble des cellules T entre les deux types de conditionnement à J+30.

Les pourcentages cellules T CD8⁺ chez les receveurs sont en revanche significativement plus élevés que chez les sujets sains, tandis que les contingents de cellules T CD4⁺ sont beaucoup plus faibles, comme attendu à cette phase précoce de la repopulation du CLTP (Figure 30).

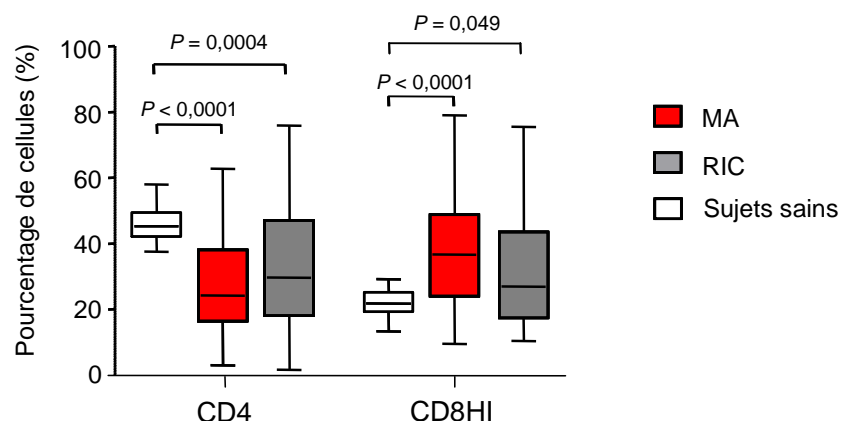


Figure 30 : Comparaison des pourcentages de cellules T CD4⁺ et CD8 (CD8^{HI}). Les cellules T CD4⁺ et CD8^{HI} sont représentées en pourcentage de la population T totale à J+30 post-greffe chez des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (MA, en rouge) ou un conditionnement atténué (RIC, en gris) en comparaison avec les sujets sains (en blanc). Les boîtes représentent la médiane encadrée par le 25^{ème} et 75^{ème} percentile. Les «moustaches» correspondent au minimum et au maximum. La valeur de P a été calculée par un test de Mann-Whitney.

1.3. Composition du compartiment lymphocytaire T en cellules T naïves et mémoires chez les receveurs à J+30 post-greffe, comparé aux sujets sains

Qu'il s'agisse d'un conditionnement myéloablatif ou réduit, la proportion des cellules T de phénotype non naïf est sensiblement la même un mois après la greffe. Comme attendu, les populations T naïves $CD4^+$ et $CD8^+$ ne représentent qu'environ 1/5 de la population T totale (Figure 31), tandis que chez les adultes sains d'âge comparable, cette population naïve représente plus de la moitié des cellules T.

Chez les receveurs, les cellules T $CD4^+$ circulantes sont composées à 80% de cellules T_{CM} et de T_{EM} réparties en parts égales, laissant supposer une différenciation accrue et/ou une prolifération homéostatique plus efficace, car chez un adulte sain, les cellules T mémoires $CD4^+$ présentent un contingent de T_{CM} plus intense.

Les cellules T $CD8^+$ mémoires représentent les trois quarts des cellules circulantes et sont majoritairement de phénotype effectrices mémoires ou différenciation terminale réparties en parts égales.

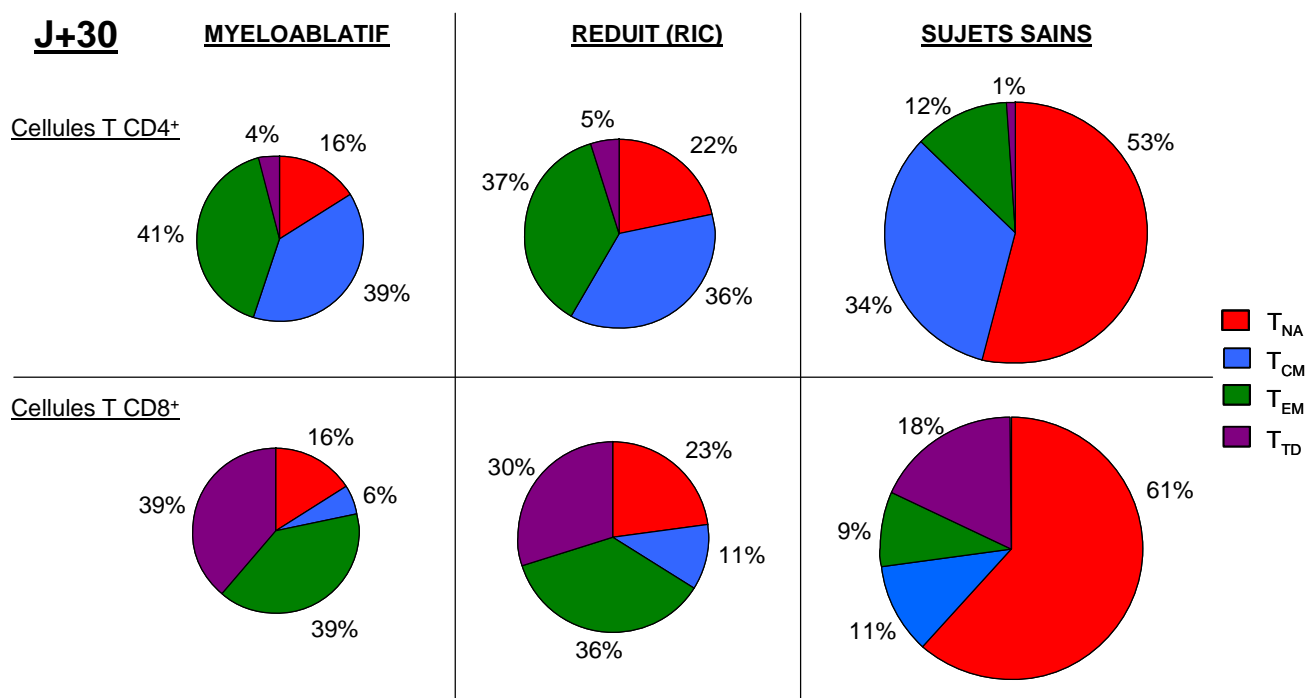


Figure 31 : Composition du contingent $CD4^+$ et $CD8^+$. Les sous-populations naïves (T_{NA}), mémoires centrales (T_{CM}), effectrices mémoires (T_{EM}) et différenciation terminale (T_{TD}) sont représentées en pourcentage de la population T totale $CD4$ ou $CD8$ à J+30 post-greffe chez des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (graphique de gauche) ou réduit (graphique du milieu) et pour comparaison chez les sujets sains (graphique de droite). La taille des graphiques est proportionnelle à la numération lymphocytaire.

2) Comparaison des taux d'IL-7 et d'IL-15 chez les patients en fonction du type de conditionnement chez les 107 receveurs

Entre les deux types de conditionnements, les cinétiques des taux d'IL-7 sont semblables et nous obtenons à J+14 des pics analogues dans les deux cohortes, avec une médiane d'IL-7 à 12 pg/mL (étendue: 0,4-30,2) après conditionnement myéloablatif et une médiane à 9,3 pg/mL (étendue: 2-26,7) après conditionnement réduit. Afin de mieux évaluer l'intensité d'exposition aux cytokines homéostatiques entre le début du conditionnement et J+30, nous avons calculé les aires sous la courbe (AUC) au cours du premier mois post-greffe. Nous n'observons pas non plus de différence significative entre les deux conditionnements pour l'exposition globale à l'IL-7 (Figure 32).

En revanche, les valeurs au pic d'IL-15 diffèrent en fonction du traitement. Après conditionnement myéloablatif, nous observons à J+14 des taux d'IL-15 à 36,3 pg/mL (étendue: 8,2-121,8) soit 6 fois plus élevés que le taux pré-conditionnement. Après conditionnement réduit, les concentrations d'IL-15 au pic à J+8 s'élèvent à 24,4 pg/mL (étendue: 5,9-70,3). L'exposition à l'IL-15 au cours du 1^{er} mois post-greffe, appréciée par l'aire sous la courbe, est également plus forte pour les receveurs recevant un conditionnement myéloablatif ($P= 0,0065$) (Figure 32). A la différence du taux systémique d'IL-7, le taux d'IL-15 circulant semble donc influencé par l'intensité du conditionnement reçu.

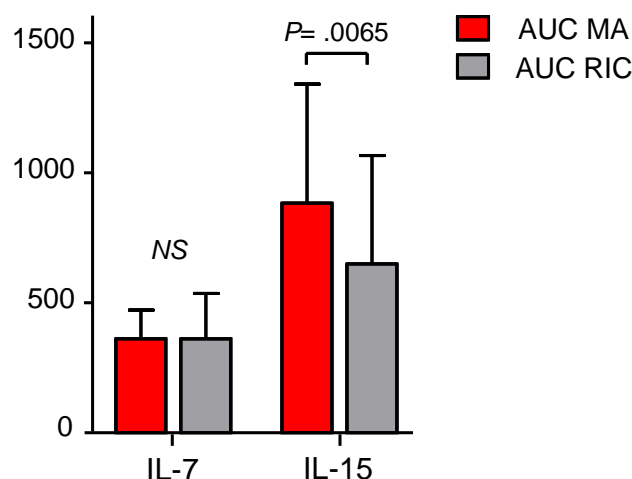


Figure 32 : Médiane des aires sous la courbe (AUC) des taux d'IL-7 et d'IL-15. Les AUC sont calculées entre le début du conditionnement jusque J+30 post-greffe de CSH. Les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (MA) sont représentés en rouge, ceux qui ont reçu un conditionnement réduit (RIC) sont représentés en gris. Les barres d'erreur représentent le 90^{ème} percentile. La différence entre les AUC a été évaluée par un test de Mann-Whitney.

3) Comparaison de l'expression de l'IL-7R α et de l'IL-2/15R β sur les sous-populations T naïves et mémoires selon le type du conditionnement

Le degré d'expression membranaire des chaînes spécifiques des récepteurs aux cytokines peut intervenir dans les variations des taux d'IL-7 et d'IL-15, puisqu'il contrôle la capture et la consommation de ces cytokines et que l'expression à la membrane peut être réprimée après ces événements. C'est pourquoi, nous avons analysé l'expression de l'IL-7R α (CD127) et l'IL-2/15R β (CD122) sur les sous-populations de cellules T naïves et mémoires, à la fois en termes de pourcentage de cellules positives et de densité membranaire (MFI).

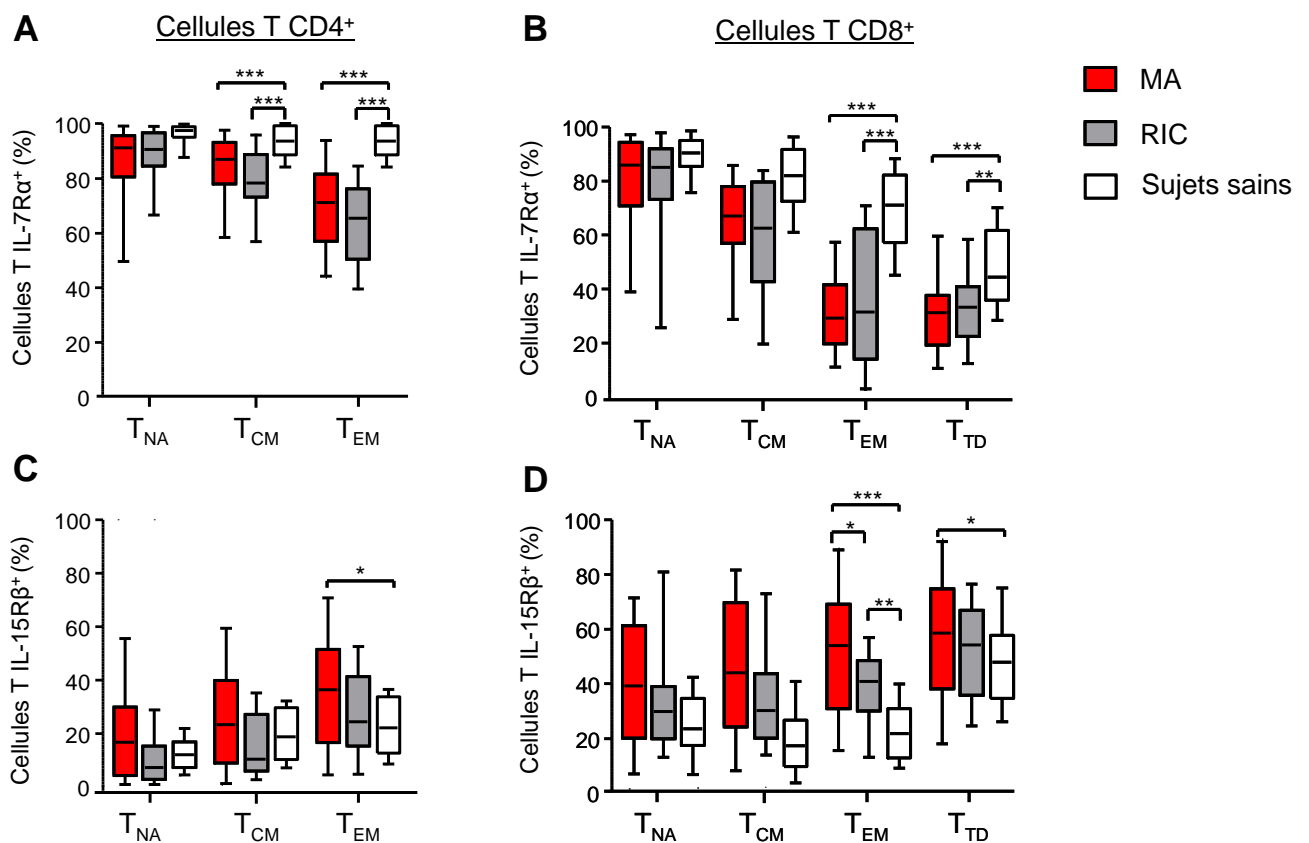


Figure 33 : Expression membranaire du CD127 et du CD122 à la surface des sous-populations T CD4⁺ et CD8⁺ à J+30. Pourcentage de cellules positives pour le CD127 dans chacune des sous-populations T CD4⁺ (A) et dans chacune des sous-populations T CD8^{hi} (B). Pourcentage de cellules positives pour le CD122 dans chacune des sous-populations T CD4⁺ (C) et dans chacune des sous-populations T CD8^{hi} (D). L'expression des récepteurs à J+30 post-greffe est représentée en rouge pour les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif et en gris pour les patients ayant reçu un conditionnement réduit. L'expression chez les sujets sains est représentée en blanc. Les boîtes représentent la médiane encadrée par le 25^{ème} et 75^{ème} percentile. «Les moustaches» correspondent au minimum et au maximum (*P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 par un test de Kruskal-Wallis et un post-test de Dunn).

Les receveurs de CSH, quelque soit le conditionnement reçu, présentent le même profil d'expression de CD127 et de CD122 sur les sous-populations de cellules T que les sujets sains. Nous avons comparé l'expression membranaire uniquement pour les populations les plus représentées chez les receveurs à J+30 post-greffe, à savoir les cellules T CD4⁺ T_{CM} et T_{EM} et les cellules T CD8⁺ T_{EM} et T_{TD}.

Nous constatons une diminution plus importante du nombre de cellules positives pour le CD127 pour ces populations T que chez les sujets sains. Toutefois, il n'y a pas de différence significative d'expression en fonction du conditionnement reçu (Figure 33A et B). Cette réduction d'expression peut être une conséquence directe des taux particulièrement élevés d'IL-7 : Park *et al.* ont en effet montré que l'exposition des cellules T à des taux élevés d'IL-7 induisait une régulation négative de l'expression de l'IL-7R α à la membrane des cellules T, essentiellement les cellules de phénotype naïf et mémoire centrale [137]. A ce stade précoce suivant l'allogreffe de CSH, la perte d'expression du CD127 peut également être consécutive à l'activation des lymphocytes. En effet, on a montré dans un modèle murin qu'au pic de la réponse immune à une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (J+8), la majeure partie des cellules activées perd l'expression du CD127 [142]. Chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, une corrélation positive a été mise en évidence entre la perte d'expression du CD127 sur les cellules T et le degré d'expression des marqueurs d'activation [429, 442]. Il est donc vraisemblable que l'activation liée à l'allo-réactivité des cellules T puisse être à l'origine de cette diminution d'expression, que celle-ci reste muette cliniquement ou que l'expansion homéostatique leur permette d'atteindre une taille clonale suffisante pour déclencher la GVH aigüe.

Les cellules CD4⁺ T_{CM} et T_{EM} chez les receveurs ont sensiblement le même contingent de cellules positives pour le CD122 que les sujets sains. En revanche, nous constatons une augmentation significative du nombre de cellules positives pour le CD122 dans les populations CD8⁺ T_{EM} et T_{TD} chez les receveurs, qui s'intensifie davantage chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif comparé aux patients ayant reçu un conditionnement réduit (Figure 33C et D). Il n'a pas été décrit de phénomène de surexpression de la chaîne IL-2/15R β dans un contexte d'inflammation ou d'activation particulier. Les taux plasmatiques d'IL-15 ne sont pas corrélés ni au pourcentage de cellules CD122⁺ ni à l'intensité de fluorescence (MFI). On ne peut cependant conclure à l'indépendance d'expression du CD122 et de la biodisponibilité de l'IL-15 car cette cytokine peut être transprésentée par les cellules dendritiques aux lymphocytes T.

4) Comparaison du degré d'inflammation chez les receveurs en fonction du type de conditionnement

Nous avons évalué l'intensité de l'inflammation en dosant la CRP plasmatique au cours des trois premiers mois post-greffe chez les receveurs (Figure 34A). Les cinétiques de la CRP dans les deux groupes de conditionnement sont analogues, avec une augmentation rapide après l'allogreffe et un retour aux valeurs normales vers J+30 post-greffe. Le pic se situe à J+7 pour les conditionnements myéloablatifs et est légèrement décalé dans le temps pour les conditionnements réduits à J+14.

La CRP est nettement plus augmentée dans les conditionnements myéloablatifs, avec une médiane de 116 mg/L contre 16 mg/L pour les conditionnements réduits, soit une valeur 7,25 fois plus élevée à J+7 ($P= 0,0001$). A J+14, les taux restent significativement plus importants chez les conditionnements myéloablatifs ($P= 0,0008$).

Le calcul des aires sous la courbe de la CRP entre le conditionnement et J+30 post-greffe montre une production globale à la CRP plus importante chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif ($P= 0,32$) (Figure 34B).

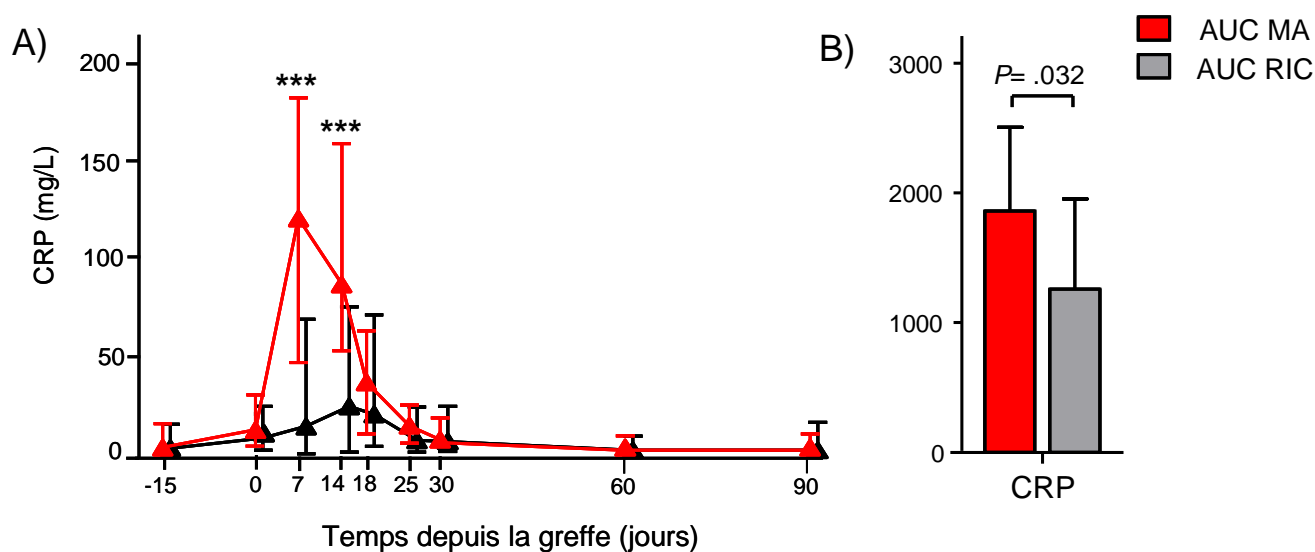


Figure 34 : (A) Concentration plasmatique de la protéine C-réactive depuis le début du conditionnement jusqu'à 3 mois post-allogreffe chez des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (ligne rouge) ou un conditionnement réduit (ligne noire). Les barres d'erreur représentent les 25^{ème}-75^{ème} percentiles. (B) Médiane des aires sous la courbe des taux de CRP depuis le conditionnement jusqu'à J+30 chez des patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (barres rouges) ou conditionnement réduit (barres grises). Les barres d'erreur représentent le 90^{ème} percentile. La valeur de P a été calculée par un test de Mann-Whitney.

Il existe, par ailleurs, une forte corrélation entre les aires sous la courbe de l'IL-15 et celles de la CRP, que ce soit après les conditionnements réduits ($P= 0,002$) ou dans les conditionnements myéloablatifs ($P= 0,0012$) (Figure 35A et B).

En revanche, le taux d'IL-7 est moins influencé par le contexte inflammatoire, comme le suggère la plus faible corrélation entre les aires sous la courbe de l'IL-7 et les aires sous la courbe de la CRP après conditionnement myéloablatif ($P= 0,016$) et l'absence de corrélation après conditionnement réduit (Figure 35C et D).

La forte corrélation entre les taux de CRP et d'IL-15 dans les deux types de conditionnement montre que ces deux paramètres évoluent de pair avec le degré d'inflammation, tandis que la biodisponibilité de l'IL-7 apparaît moins influencée par le contexte inflammatoire.

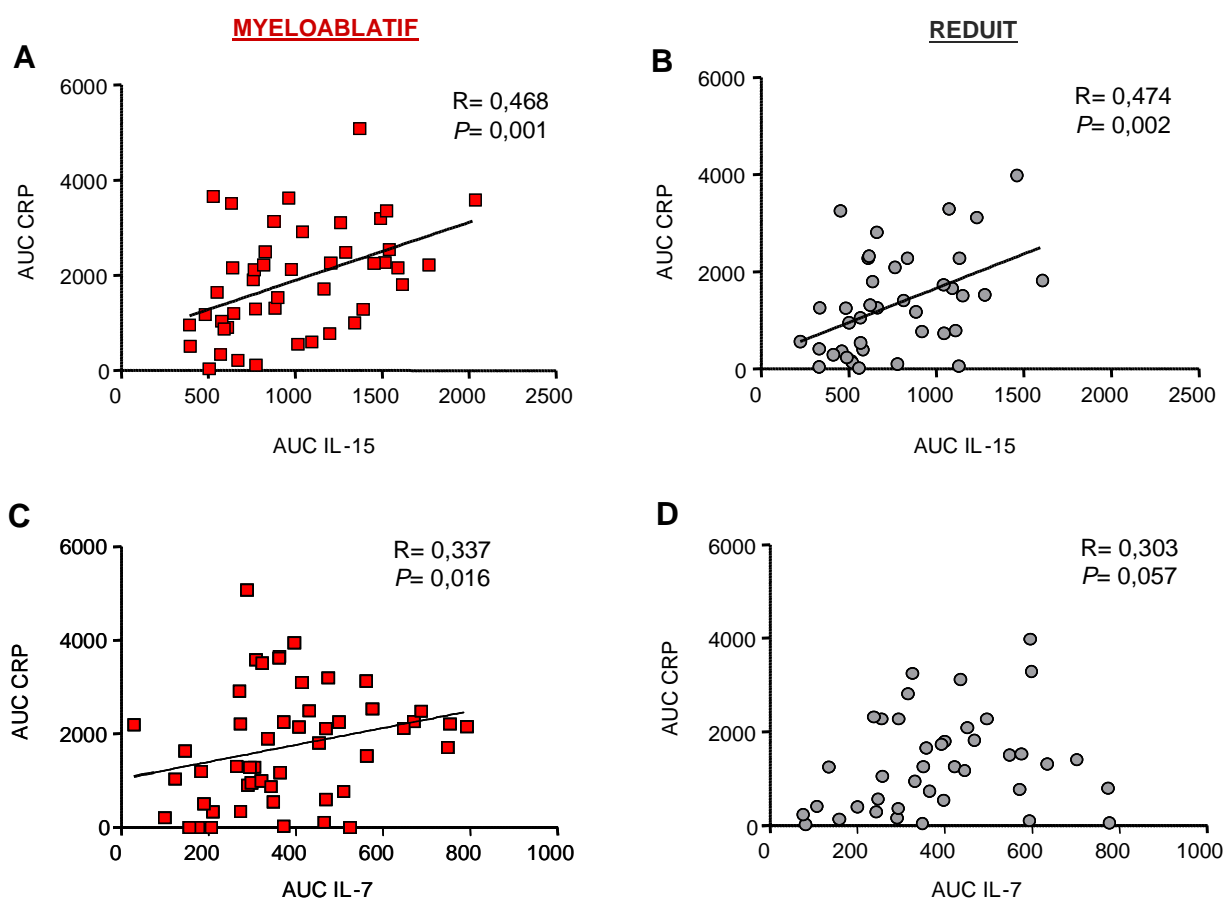


Figure 35 : *Corrélation entre les aires sous la courbe des taux d'IL-7 et d'IL-15, et de la protéine C-Réactive. Corrélation entre les aires sous la courbe d'IL-15 et de la protéine C-Réactive chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (A) ou réduit (B). Corrélation entre les aires sous la courbe d'IL-7 et de la protéine C-Réactive chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (C) ou réduit (D). Les AUC sont calculées du début du conditionnement jusque J+30 post-greffe. La valeur de P a été calculée par un test de Spearman.*

5) Valeur prédictive globale des taux d'IL-7 pour la survenue ultérieure d'une maladie du greffon contre l'hôte aiguë

La première constatation lorsque nous regroupons les receveurs ayant reçu un conditionnement myéloablatif et réduit est que les courbes de survie confirment que l'intensité du conditionnement n'est pas corrélée à la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte chez les receveurs d'allogreffe HLA-compatible apprennée ou non (Figure 36).

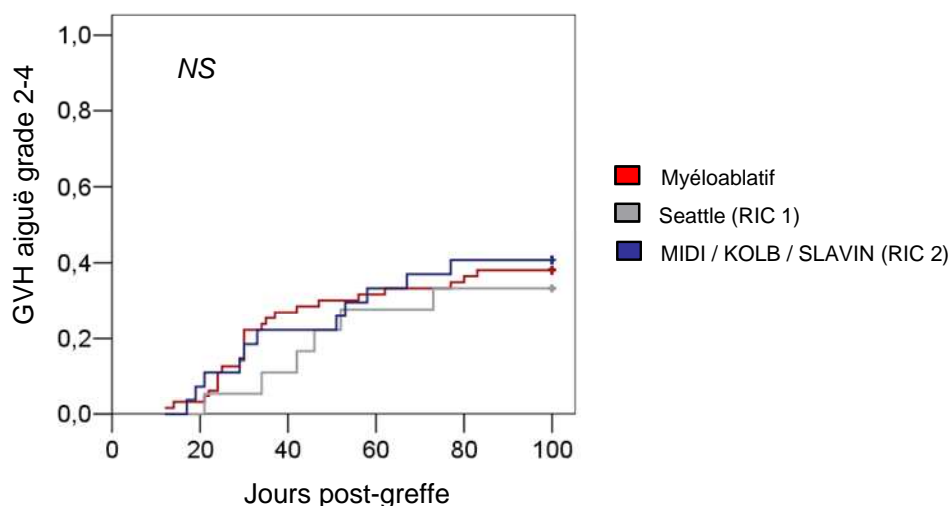


Figure 36 : Incidence de la GVH aiguë en fonction du conditionnement. Incidence cumulative selon Kaplan-Meier estimant la survenue d'une GVH aiguë grade 2-4 chez les 107 receveurs répartis en fonction de leur intensité de conditionnement: myéloablatif, Seattle (RIC 1) ou MIDI / KOLB / SLAVIN (RIC 2). Un test Log-rank vérifie que la survie cumulée en fonction des protocoles de conditionnement reçus n'est pas significative.

L'analyse de la cinétique de taux d'IL-7 confirme que les patients qui ne développent pas de GVH aiguë ont une valeur au pic à J+14 plus faible que celle des receveurs qui vont développer cette complication ($P= 0,018$). Ce décalage se poursuit au-delà de J+90 ($P= 0,029$) malgré une correction de la lymphopénie dès J+30 (400 cellules T CD45⁺/mm³ ; étendue: 50-3050) (Figure 37A).

L'exposition globale à l'IL-7 a été appréciée par le calcul de l'aire sous la courbe entre J-15 et J+30. La médiane des AUC est de 52,6 (étendue: 11,3-115,4) et les valeurs individuelles sont positivement corrélée avec la survenue de la GVH aiguë de grade 2 à 4 ($R= 0,321$, $P= 0,002$) ainsi qu'avec sa sévérité définie par les grades 0 à 4 ($R= 0,317$, $P= 0,002$). La corrélation est inverse avec le temps de survenue ($R= -0,271$, $P= 0,01$) (Figure 37B et C).

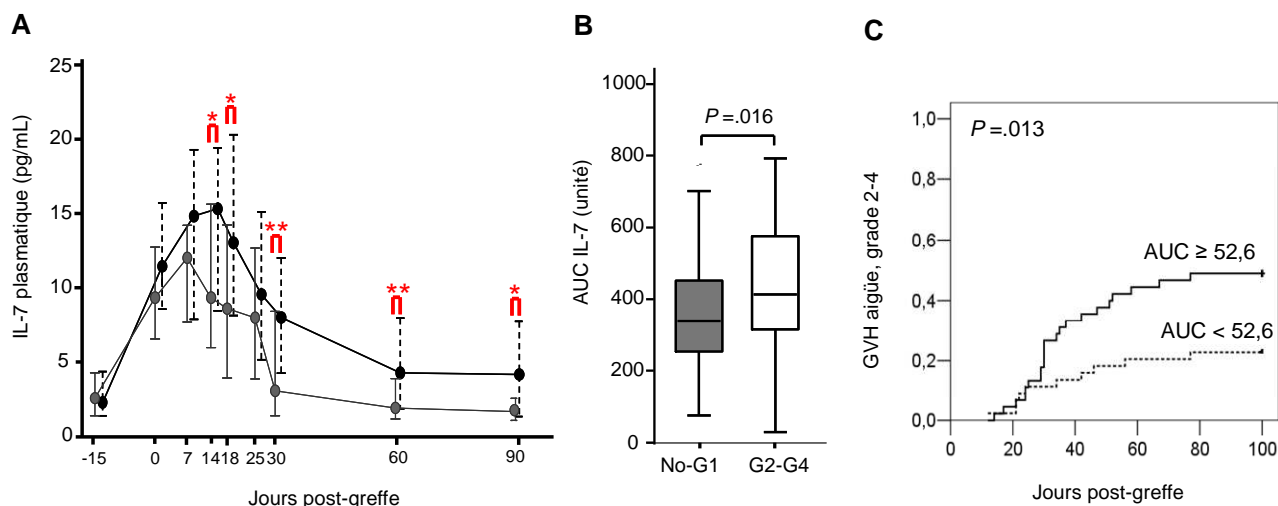


Figure 37 : Incidence de la GVH aiguë en fonction du taux plasmatique d'IL-7 (A) Médiane d'IL-7 depuis le début du conditionnement jusque 3 mois post-greffe chez les 107 patients qui développent une GVH aiguë grade 2-4 (ligne noire) ou pas (ligne grise). Les barres d'erreurs représentent les 25^{ème}-75^{ème} percentile. La valeur du P est calculée par un test de Mann-Whitney (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). (B) Médiane des aires sous la courbe d'IL-7 depuis le début du conditionnement jusque 1 mois post-greffe chez les 107 patients qui développent une GVH aiguë grade 2-4 (boîte blanche) ou pas (boîte grise). Les boîtes représentent la médiane encadrée par le 25^{ème} et 75^{ème} percentile. «Les moustaches» correspondent au minimum et au maximum. La valeur du P est calculée par un test de Mann-Whitney. (C) Kaplan-Meier estimant la survenue de la GVH aiguë de grade 2-4, chez les receveurs répartis en fonction des valeurs des aires sous la courbe des taux d'IL-7 supérieure à la médiane (ligne noire continue) versus inférieure à la médiane (ligne noire discontinue). La valeur du P est calculée par un test de Log-rank.

Le taux d'IL-7 à J+18 (médiane= 9,9 ; étendue: 0,6-28,8 pg/mL) reste le facteur prédictif le plus significatif de la survenue ultérieure d'une GVH aiguë chez nos 107 patients quelque soit le conditionnement reçu, ainsi que le vérifie l'analyse en modèle de Cox (Hazard Ratio= 1,079; intervalle de confiance 95%: 1,022-1,139; $P = 0,006$). Nous pouvons noter que le temps correspondant à la valeur la plus prédictive est un temps intermédiaire entre J+14 et J+30, qui sont les deux temps prédictifs retrouvés dans les conditionnements et réduits respectivement.

Les taux d'IL-7 à des temps précoces après l'allogreffe de CSH sont donc associés au risque de survenue ultérieure de la GVH aiguë. Cependant, la spécificité (= 58,57 ; 95% CI: 43,2-73), pour les 107 patients et la sensibilité (= 64,3 ; 95% CI: 44,1-81,4) à la valeur prédictive de 9,8 pg/mL à J+18 ne sont pas totales, ce qui suggère l'intervention de facteurs associés.

La réponse des lymphocytes T à la cytokine est subordonnée à l'expression et la fonctionnalité de son récepteur, en l'occurrence la chaîne spécifique IL-7R α . Les patients qui développent une GVH aiguë de grade 2-4, quelque soit le conditionnement initial, présentent une plus faible densité d'expression du CD127 que les patients indemnes, comme discuté précédemment. Ce résultat permet de penser que l'expansion homéostatique pilotée par l'IL-7 et l'activation liée à l'allo-réactivité des cellules T puissent conjointement être à l'origine de cette diminution d'expression. Ce

paramètre n'atteint pas le seuil de significativité en analyse multivariée, ce qui peut être attribué à la liaison de la densité membranaire du CD127 au taux d'IL-7. Cependant, la détection d'expression de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-CD127 ne permet pas, à elle seule, d'affirmer que la chaîne IL-7R α est fonctionnelle.

Le séquençage du gène de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 a révélé l'existence d'une série de polymorphismes correspondants à des variants nucléotidiques simples (SNPs). Plusieurs SNPs responsables de substitutions d'acides aminés dans l'ectodomaine ou le passage transmembranaire de la chaîne alpha ainsi que des polymorphismes de son promoteur ont été récemment identifiés. Ils permettent de définir 4 haplotypes communs, dont l'un (haplotype 4) est associé à une maladie immuno-inflammatoire, la sclérose en plaque [446].

Dans le cadre de l'allogreffe de CSH, 4 polymorphismes non synonymes (+510C/T, +1237 A/G, +2087T/C and +3110A/G) qui entraînent un changement d'acide aminé ont été étudiés par l'équipe du Professeur Klaus Müller à Copenhague (The Tissue Typing Laboratory, Rigshospitalet). Dans une étude rétrospective portant sur 109 paires de donneurs et receveurs non apparentés, le génotype +1237/GG (rs_1494555) du donneur de CSH est associé en analyse univariée ($P= 0,003$) et multivariée ($P < 0,05$) à la mortalité non liée à la rechute chez des receveurs qui ont un chimérisme hématopoïétique de type donneur de 100%. Quoique les conséquences sur la fonctionnalité du récepteur à l'IL-7 ne soient pas connues, cette association génétique a été interprétée comme suggestive d'un effet sur la réponse à l'IL-7 (ou à la TLSP) des lymphocytes T greffés, dans la mesure où la substitution d'acide aminé selon l'allèle est localisée dans l'ectodomaine de l'IL-7R α [419]. Cette association n'a pas été confirmée par une étude rétrospective indépendante portant sur 116 paires donneurs/ receveurs, d'ethnicité au moins partiellement différente [447].

Nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe du Professeur Klaus Müller afin de déterminer chez les donneurs de nos patients si des associations pouvaient être identifiées entre certains polymorphismes bi-alléliques et l'accumulation d'IL-7 chez le receveur et les complications de l'allogreffe.

Partie 5 : Association du polymorphisme nucléotidique simple +510 (rs-1494558) du gène de l'IL-7R α au risque de maladie du greffon contre l'hôte

Trois polymorphismes du gène de l'IL-7R α (+510C/T sur l'exon 2, +1237A/G, sur l'exon 4, +2087T/C sur l'exon 6) ont été déterminés chez les donneurs des 107 patients dont les caractéristiques ont été présentées dans la Table 6 P 117 ci-dessus.

Les polymorphismes bi-alléliques +510C/T et +1237A/G entraînent un changement d'acide aminé dans l'ectodomaine de la chaîne alpha mature (I66T et V138I), le variant +2087T/C affecte son passage trans-membranaire (T224I), la substitution affectant l'épissage conduisant aux isoformes membranaire et soluble de l'IL-7R α (Figure 38).

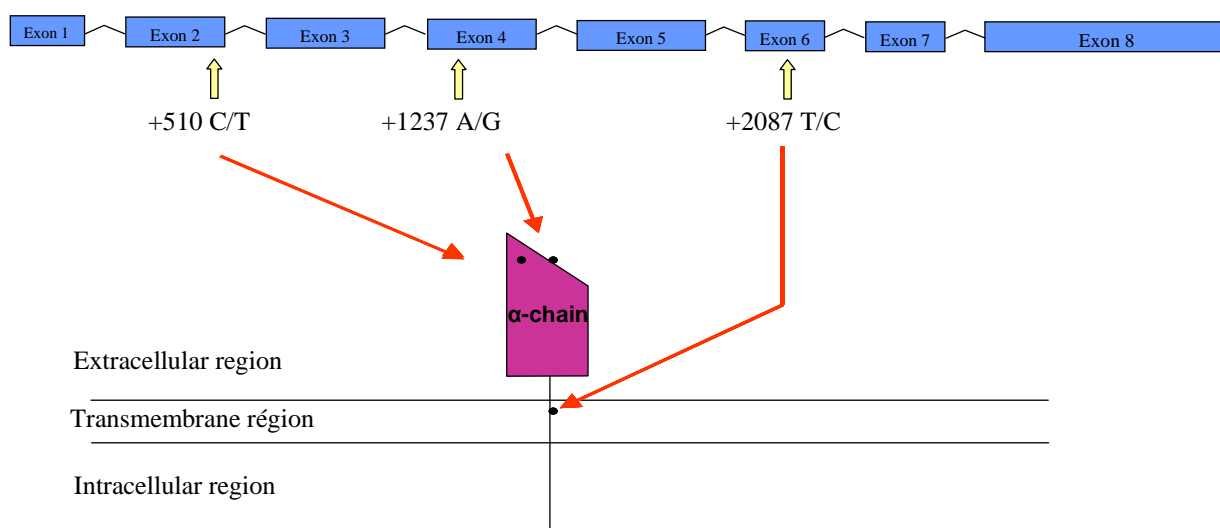


Figure 38 : Position des SNPs de l'IL-7R α étudiés chez les donneurs de nos 107 patients

Bien que le nombre de sujets soit limité comparativement au nombre qu'exigent les études génétiques d'association, nous avons pu vérifier que l'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté pour l'ensemble de nos donneurs et que la distribution des allèles pour chacune de ces positions est en conformité avec celle décrite dans la littérature par Teutsch [446] ou plus récemment par [419] et répertoriée pour une population occidentale dans la banque NCBI [448]. Les génotypes homozygotes +510TT sont présents chez 14,8 % des donneurs, +1237GG chez 14% et +2087TT chez 10,2% des donneurs d'allogreffe de CSH. (Tableau 9).

SNP	Fréquence des génotypes (%)	Fréquence de l'allèle rare chez nos 107 donneurs	Fréquence de l'allèle rare selon Teutsch, 2003
+510			
CC	42,6		
CT	42,6	0,36	0,38
TT	14,8		
+1237			
AA	42		
AG	44	0,36	0,31
GG	14		
+2087			
CC	58,2		
CT	31,6	0,26	0,33
TT	10,2		

¹ Distribution calculated by Fischer test.

Tableau 9 : Fréquence de distribution des allèles pour chaque SNPs de l'IL-7Ra dans la cohorte étudiée des 107 donneurs. La fréquence des allèles est présentée en pourcentage. Les fréquences des allèles rares « q » ont été calculées par un test de Fischer et sont comparées aux valeurs retrouvées dans la littérature.

Nous n'observons pas de relation significative entre les polymorphismes +1237 et +2087, les taux d'IL-7 ou le degré d'expression du CD127 estimé en pourcentage de cellules positives ou en intensité médiane de fluorescence membranaire. En revanche, les variations du taux d'IL-7 sont associées au polymorphisme +510. Les patients ayant reçu des CSH d'un donneur homozygote +510TT ont des taux d'IL-7 plus faibles à J+7 ($P= 0,045$), J+18 ($P= 0,017$) et J+25 ($P= 0,0174$) (Figure 39A).

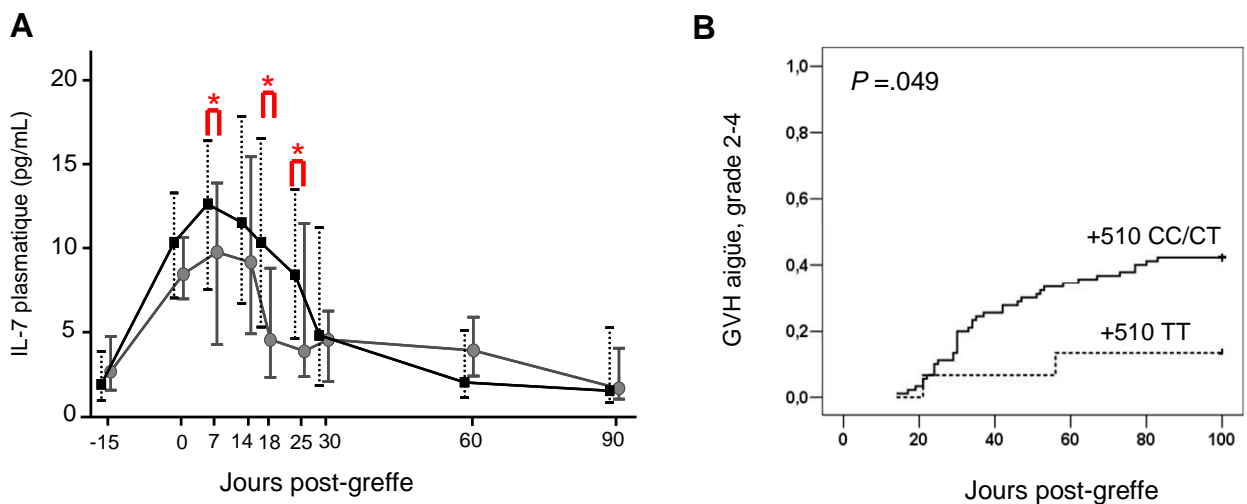


Figure 39 : Relation entre les taux d'IL-7, la survenue d'une GVH aiguë et le polymorphisme +510 de la partie codante du gène de l'IL-7Ra (A) Médiane des taux plasmatiques d'IL-7 du début du conditionnement jusque 3 mois post-greffe chez les patients dont les donneurs sont caractérisés par les génotypes +510 CT/CC (ligne noire) versus l'homozygotie +510 TT (ligne grise). Les barres d'erreurs représentent les 25-75^{ème} percentiles. Les comparaisons entre les deux groupes ont été réalisées par un test de Mann-Whitney (* $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$). (B) Courbe de Kaplan-Meier estimant l'incidence cumulée de GVH aiguë de grade 2-4 chez les patients dont les donneurs ont les génotypes +510 CT/CC (ligne continue) versus +510 TT (ligne pointillée); La valeur de P a été calculée par un test Log-rank.

En catégorisant les patients en fonction des génotypes de leur donneur : +510CC ou CT d'une part, +510TT d'autre part, nous montrons que le risque de GVH aiguë de grade 2-4 est plus élevé dans le sous-groupe de receveurs ayant reçu un greffon de donneur homozygote +510CC ou hétérozygote +510CT (Log-rank= 3,867, $P= 0,049$) (Figure 39B). Ces patients sont ceux qui présentent également les taux d'IL-7 les plus élevés dans notre population de receveurs d'allogreffe de CSH. Les patients recevant des cellules de génotype homozygote +510TT semblent donc avoir un risque atténué de GVH aiguë et présentent des taux d'IL-7 plus faibles durant le premier mois qui suit l'allogreffe. L'analyse en modèle de Cox annule les deux variables : taux d'IL-7 à J+18 et polymorphisme +510. On conserve cependant une tendance proche de la significativité pour les taux d'IL-7 à J+18 ($P= 0,051$).

Avec la méthodologie de l'équipe du Professeur Klaus Müller, nous ne confirmons donc pas l'association aux variant +1237 G, mais rappelons que leur étude d'association concernait l'ensemble des complications non liées à la rechute.

Sachant qu'il s'agit d'un polymorphisme non synonyme, une première possibilité à envisager pour interpréter nos résultats serait que l'expression de l'allèle +510 C, impliqué dans le codage d'une thréonine en position 66 (44 de la protéine mature) confère une meilleure réponse à l'IL-7 à taux égal que celle due à l'isoleucine définie par l'allèle +510 T et, par le biais de l'expansion homéostatique accrue, une alloréponse anti-hôte plus sévère. Il faut alors proposer aussi que la forme commune de la chaîne α capte moins bien, mais réponde mieux, à son ligand puisque les génotypes « donneur » correspondants sont associés à un pic plus élevé d'IL-7 circulante, tandis que le génotype +510TT entraînerait une consommation relativement accrue (par meilleure affinité) mais une moins bonne réponse à la cytokine. Faute d'études physiques de liaison ou d'études des voies de transduction, cette proposition reste très hypothétique. On peut d'ailleurs noter que la position 44 de l'ectodomaine est à distance des boucles responsables de la liaison du récepteur à son ligand comme des motifs d'interaction avec la sous-unité γ commune [82].

L'association statistique pourrait aussi refléter un autre polymorphisme en déséquilibre au sein de l'haplotype 1 qui inclut le variant +510 T. Cet haplotype est l'un des deux qui ont été associés à une bonne aptitude à surexprimer le CD127 en réponse à l'interféron- β [104]. Les interférons de type I peuvent s'intégrer dans l'orage cytokinique consécutif au conditionnement pré-greffe de CSH, mais nous n'avons pas constaté de différence de pourcentage de lymphocytes T CD127⁺ ou d'intensité de fluorescence du CD127 qui correspond aux génotypes des donneurs étudiés. En outre dans cette hypothèse si une meilleure consommation d'IL-7 par les lymphocytes de génotype +510 est compatible avec le moindre pic d'IL-7 associé, on s'attendrait plutôt à une association positive avec la GVH aiguë. L'haplotype incluant le variant +510 T est en déséquilibre avec des variants du promoteur contrôlant des éléments de réponse à des facteurs de transcription comme les facteurs NFAT ou Oct-6, qui pourraient modifier le contrôle de l'expression du gène de l'IL-7R α dans un sens qui reste inconnu [446].

DISCUSSION
GENERALE ET
CONCLUSION

Grâce à l'étude prospective de 107 patients répartis en 2 cohortes, l'une après conditionnement myéloablatif, l'autre après conditionnements d'intensité réduite, nous présentons dans ce mémoire la première étude à la fois conjointe des taux plasmatiques des deux cytokines homéostatiques principales, et comparative de différents protocoles de conditionnement.

La production d'IL-7 et d'IL-15 est assurée principalement par des cellules stromales, les épithéliums et les cellules dendritiques. De même, les processus impliqués dans la physiopathologie de la GVH aiguë et de la rechute sont davantage locaux que systémiques. Par conséquent, la détermination séquentielle des taux d'IL-7 et d'IL-15 à partir de prélèvements de sang veineux périphérique soulève la question de la pertinence de ce type de prélèvement et de l'interprétation de ces dosages.

Plusieurs publications permettent de vérifier la concordance entre les taux circulants d'IL-7 ou d'IL-15 et les quantités de protéine au niveau tissulaire. Une étude réalisée dans un groupe de patients souffrant de psoriasis montre en effet une augmentation conjointe de la protéine IL-7 à la fois au niveau des biopsies cutanées en zone lésée et au niveau sérique [449]. D'autres études ont mis en évidence une augmentation des taux d'IL-15 équivalente dans le liquide cébrospinal et dans le sérum de patients atteints de maladies neuro-inflammatoires [424]. Une interprétation des taux de ces deux cytokines dans le plasma est peut donc être considérée comme un assez bon reflet des microenvironnements tissulaires.

Un biais méthodologique des dosages plasmatiques doit également être considéré, puisqu'il existe des formes solubles des chaînes spécifiques, la chaîne IL-7R α et de la chaîne IL-15R α . Elles résultent d'un processus d'épissage alternatif ou d'exocytose (shedding) de la protéine et sont donc susceptibles d'être en concentration plus grande si la synthèse des récepteurs est accrue. En raison de leur affinité pour la cytokine, ces récepteurs solubles pourraient interférer avec le dosage de cette dernière. En fait, plusieurs travaux rapportent l'élévation conjointe des taux de l'IL-7R α soluble et de la cytokine dans la synoviale inflammatoire [450] comme dans le plasma [451]. On montre également que des concentrations picomolaires d'IL-7 restent libres compte-tenu de la constante de dissociation et des concentrations physiologiques du récepteur soluble [452]. De plus, nous ne retrouvons pas d'association avec le polymorphisme nucléotidique +2087T/C (rs_6897932) qui prédispose à produire plus la forme soluble du récepteur [453]. Les formes solubles de l'IL-15R α augmentent également parallèlement aux taux sériques d'IL-15 [454, 455].

Nous avons présenté en détail dans l'introduction de ce mémoire les arguments qui permettent de relier les cytokines homéostatiques, l'expression différentielle de leurs récepteurs par les sous-populations naïves et mémoires et l'engagement des récepteurs des lymphocytes T dans le pilotage conjoint de l'expansion homéostatique périphérique des lymphocytes T. Nous avons également discuté l'impact de cette repopulation progressive du compartiment lymphocytaire périphérique dans

le contexte de l'allogreffe de CSH où les lymphocytes T du receveur sont confrontés aux disparités d'antigènes mineurs d'histocompatibilité et aux antigènes tumoraux.

Sachant le rôle potentialisateur de l'expansion induite par la lymphopénie sur l'alloréactivité, il est logique que nous ayons pu démontrer une association significativement entre la valeur au pic des taux d'IL-7 et d'IL-15 et la survenue ultérieure d'une maladie aiguë du greffon contre l'hôte. L'analyse multivariée révèle dans nos deux cohortes que des taux plus élevés d'IL-7 sont un facteur de risque essentiel de cette complication, tandis qu'à l'inverse un pic réduit d'IL-15 précède la rechute de l'hémopathie maligne qui avait conduit à poser l'indication de cette immunothérapie.

S'agissant de l'association IL-7/GVH aiguë, nous confirmons les données de l'équipe de Mackall qui ont été publiées tandis que notre travail était engagé [401]. Leur étude concernait 31 patients qui avaient reçu un conditionnement atténué composé de fludarabine (30 mg/m²/jour) et de cyclophosphamide (1200 mg/m²/jour) pendant 4 jours, délibérément précédé de un à trois cycles d'induction associant de l'étoposide, de la prednisone, de la vincristine, du cyclophosphamide, de la doxorubicine, et de la fludarabine (EPOCH-F), avec des patients qui avaient en base des taux élevés d'IL-7 (médiane 12,1 pg/mL, maximum à 46,9 pg/mL).

L'incidence des maladies aiguës du greffon contre l'hôte de grade 2-4 chez nos patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (32,5%) ou un conditionnement atténué (35,5%) est en accord avec plusieurs études publiées [287, 382, 385]. Le délai de survenue de cette complication est plus tardif après les conditionnements réduits, avec une médiane de 42 jours post-greffe, soit 2 semaines plus tard que dans les conditionnements myéloablatifs, ce qui est conforme aux données de la littérature [288, 332].

Cette variation temporelle est en parfaite adéquation avec les pics retrouvés lors des dosages d'IL-7. En effet, dans les conditionnements myéloablatifs, le taux prédictif en analyse multivariée est à J+14 tandis que dans les conditionnements réduits, c'est le taux à J+30 qui se révèle prédictif. La valeur prédictive du taux d'IL-7 est ciblée sur J+7 dans le protocole intensif adopté par l'équipe de Mackall, qui indique une médiane de survenue de la GVH aiguë à 33 jours, soit un délai analogue à celui de nos patients recevant un conditionnement myéloablatif [401]. Lors de l'analyse de nos 107 patients regroupés, le taux d'IL-7 à J+18 se révèle comme le facteur prédictif le plus significatif de la survenue ultérieure d'une GVH aiguë en modèle de Cox.

Nous avons cherché à affiner nos résultats en comparant la cinétique des taux d'IL-7 et l'incidence de la GVH aiguë aux variants génétiques du gène de la chaîne IL-7R α chez le donneur d'allogreffe. Une association positive a été retrouvée avec les génotypes +510 CC ou CT, mais ces résultats sont encore très préliminaires, ils devront être complétés sur un effectif bien plus grand, et leur interprétation devra attendre que des études de l'affinité pour l'IL-7 ou de réponse à l'IL-7 en fonction des haplotypes soient réalisées.

Malgré les résultats significatifs de nos analyses multivariées associant la valeur au pic d'IL-7 au risque de survenue de la maladie aiguë du greffon contre l'hôte, d'autres facteurs susceptibles d'influencer cette complication devront être considérés.

L'un de ces facteurs de risque est évidemment la disparité donneur/receveur concernant les antigènes mineurs d'histocompatibilité. Le typage moléculaire de ces antigènes mineurs n'était pas disponible, mais il faut noter que l'interprétation serait délicate. En effet, tous les allopeptides ne sont pas nécessairement immunodominants [456-458], et on signale une possibilité de tolérance naturelle vis-à-vis de ces disparités [459, 460].

Un autre facteur évident est la fréquence des cellules alloréactives au sein des lymphocytes T apportés par le donneur. Si des sensibilisations vis-à-vis des alloantigènes mineurs sont connues [459, 461], ce qui amène à impliquer les populations de lymphocytes mémoires au sein du greffon, plusieurs études, dont celle de notre équipe, indiquent que les populations de cellules T CD4⁺CCR7⁺ ou CD62L (composées de cellules naïves et mémoires centrales) contiennent l'essentiel des précurseurs alloréactifs [296, 313, 462]. La proportion des lymphocytes naïfs et mémoires centrales au sein du greffon joue de ce fait un rôle déterminant dans le risque de développement de la GVH aiguë en cas d'identité HLA.

L'IL-15, par son action directe sur l'expansion des cellules T CD8⁺ mémoires et ses effets contributifs à la prolifération des populations lymphocytaires T naïves, apparaît renforcer l'action de l'IL-7 en potentialisant son rôle dans l'alloréactivité. Au plan statistique, son impact s'efface derrière celui de l'IL-7 en analyse multivariée du risque de GVH aiguë.

Les relations entre les taux d'IL-15 et la rechute n'avaient jamais été évaluées chez l'Homme. Nous montrons que de faibles taux d'IL-15 à J+14 sont associés en analyse univariée et multivariée au risque ultérieur de survenue de la rechute dans notre cohorte de patients sous conditionnement myéloablatif. Après conditionnements réduits, seuls les taux d'IL-7 et d'IL-15 à J+90 post-greffe sont inversement corrélés au risque de rechute, ce qui n'a pas d'intérêt pour la surveillance des patients mais révèle néanmoins la similitude d'impact des taux d'IL-15 sur cette complication. Il faudra évidemment prolonger le suivi de nos patients pour conforter ces résultats.

Le risque de rechute chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (25%) et ceux ayant reçu un conditionnement réduit (26,7%) est identique dans nos cohortes. Le risque de rechute ne diffère pas entre donneur familial et donneur non apparenté, conformément à l'expérience française [313]. Les délais de survenue de cette complication sont également similaires avec une médiane de 132 jours post-greffe (étendue : 82-347) chez les patients avec un conditionnement réduit et une médiane de 140 jours post-greffe (étendue : 50-551) chez les patients recevant un conditionnement myéloablatif. Par contre, plusieurs études ont retrouvé un risque de rechute plus élevé après conditionnement atténué [391, 392] [463]. Cette différence peut être liée à l'effectif faible de nos deux cohortes ainsi qu'à une médiane de suivi plus courte.

Les taux plus faibles d'IL-15 plasmatique chez les patients qui vont rechuter peuvent être responsables d'une promotion insuffisante de l'alloréactivité et de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T en expansion homéostatique. En effet, il a été montré qu'une faible reconstitution des cellules mémoires effectrices T CD8⁺CD28^{negatives} au cours des deux premiers mois post-greffe était corrélée à un risque élevé de rechute [464]. L'IL-15 potentialise la réponse anti-tumorale [465, 466],

en favorisant la différenciation des cellules T CD8⁺ en cellules T cytotoxiques [467] et la production d'IFN- γ et de perforine [468, 469]. Un taux insuffisant d'IL-15 peut également être responsable d'une promotion insuffisante de l'action anti-tumorale des cellules NK principalement dans le cadre d'hémopathies touchant les lignées myéloïdes [470]. L'équipe de Chen montre que les cellules NK du donneur, stimulées en présence d'IL-15 et infusées chez le receveur, peuvent diminuer le risque de rechute [471]. L'IL-15 agit en effet comme un facteur de prolifération et de différenciation des populations lymphocytaires T CD8⁺ et NK [185, 204], et des taux adéquats permettraient donc une bonne reconstitution de ces populations lors des premiers mois post-greffe [472], leur permettant d'exercer l'une et l'autre une action anti-tumorale protectrice.

Outre cette analyse de l'intérêt prospectif de la détermination précoce des taux plasmatiques des taux d'IL-7 et d'IL-15, nous nous sommes attachés à analyser les relations entre l'évolution quantitative et qualitative de la lymphocytose chez le receveur et la cinétique des taux des cytokines homéostatiques en tenant compte de l'intensité du conditionnement reçu au préalable.

Nous confirmons l'évolution en miroir des taux d'IL-7 et de la lymphocytose, ainsi que les données de l'équipe de Mackall qui ont été publiées tandis que notre travail était engagé [401]. Nous montrons de plus que la cinétique des taux d'IL-7 post-allogreffe est assez semblable quelque soit l'intensité des différents protocoles de conditionnement et que la valeur du pic d'IL-15 est inversement associée au risque de rechute au moins dans le cas des greffes sous conditionnement myéloablatif. La lymphopénie induite par les conditionnements dits atténués semble toujours dépasser le seuil critique pour entraîner l'élévation concomitante des taux plasmatiques d'IL-7 et d'IL-15. Le conditionnement le moins sévèrement lymphopéniant (protocole « Seattle » associant fludarabine et irradiation corporelle à dose modérée) est suivi d'un pic d'IL-7 et d'IL-15 moins élevé que les autres protocoles de conditionnement d'intensité réduite, qui vont induire une valeur au pic d'IL-7 équivalente à celle des conditionnements myéloablatifs, pourtant responsables d'une lymphopénie plus prolongée au-delà du premier mois post-greffe.

Le suivi prospectif de notre cohorte a inclus des receveurs d'allogreffe de CSH ayant reçu deux grands types de conditionnement définis selon la terminologie classique, myéloablatif versus atténué. Toutefois, en empruntant la classification proposée par Dhédin et coll. [443] qui tient compte du pouvoir lymphopéniant plus ou moins drastique des conditionnements dits atténués, nous avons pu affiner cette classification et scinder ce groupe en deux : un groupe de receveurs ayant un conditionnement réduit de type Seattle (RIC 1) et un deuxième groupe pour les conditionnements réduits de type MIDI, KOLB ou SLAVIN (RIC 2).

Au cours du premier mois suivant la greffe, ces différents conditionnements sont responsables d'une déplétion lymphocytaire initiale, sévère, voire totale au niveau du compartiment circulant pour les conditionnements myéloablatifs et certains conditionnements réduits (RIC 2). Au cours du 2^{ème}

mois, tandis que la majorité des receveurs avec un conditionnement myéloablatif présentent toujours une lymphopénie profonde et peinent à reconstituer leur compartiment, presque la moitié des receveurs ayant eu un conditionnement atténué et tout particulièrement ceux appartenant au groupe RIC 1, parviennent à une reconstitution quantitative de leur compartiment T périphérique. Ces différences importantes de reconstitution du CLPT selon le conditionnement persistent au cours des six premiers mois post-greffe chez nos receveurs.

L'orage de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF) provoqué par le conditionnement pré-greffe pourrait conduire à une production accrue des cytokines homéostatiques, et tout particulièrement d'IL-15, et contribuer à l'élévation brutale de leur taux plasmatique. Nous avons comparé le degré d'inflammation de nos groupes de receveurs grâce à la détermination des taux plasmatiques de CRP dont l'augmentation après allogreffe a déjà été décrite [380]. Les taux de CRP chez les receveurs ayant eu un conditionnement réduit sont nettement plus faibles que ceux observés chez les patients recevant un conditionnement standard.

Les aires sous la courbe des taux d'IL-7 entre le début du conditionnement et le premier mois post-greffe sont corrélées à celles des taux de la CRP uniquement après un conditionnement myéloablatif, connu pour induire un degré d'inflammation plus élevé que les conditionnements réduits. A priori, les cellules stromales ou les cellules dendritiques, productrices d'IL-7 et d'IL-15 ne sont pas ou peu touchées par les traitements aplasants [473]. Dans un contexte inflammatoire, les mécanismes régulant la production d'IL-7 sont encore mal connus. Certaines cytokines parmi lesquelles le TNF- α , l'IL-1 [474], l'IL-6 [475] ou encore l'IFN- γ [476-478] pourraient induire une production accrue d'IL-7 par le stroma ou les cellules épithéliales. Dans un modèle murin d'encéphalomyélite expérimentale, Sawa montre que l'activation des Toll-like récepteurs lors d'une infection induit une production d'IFN- β par les cellules sentinelles locales (cellules dendritiques, monocyte/macrophage..) qui entraîne alors une production d'IL-7 par les hépatocytes mais une diminution de la production par les cellules stromales et les ganglions lymphatiques selon un mécanisme encore inconnu [475].

Cette corrélation entre taux de CRP et taux d'IL-7 a été mise en évidence au cours de la polyarthrite rhumatoïde [479] et l'implication de l'IL-7 est évoquée dans plusieurs maladies à composante inflammatoire. Des taux d'IL-7 élevés sont ainsi retrouvés dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [128, 480] et lors du choc septique [481]. L'expression de l'IL-7, évaluée par immunohistochimie, est également plus élevée dans les glandes salivaires labiales de patients atteints de syndrome de Sjögren [482].

Si le degré d'inflammation lié au conditionnement pré-greffe peut contribuer à l'augmentation des taux plasmatiques d'IL-7, une lymphopénie sévère apparaît être l'élément déclenchant majeur. L'ensemble de nos receveurs sont très lymphopéniques entre J0 et J+14 avec un nombre de cellules T qui évolue sensiblement de la même façon dans les deux groupes jusque J+30. A cette période, les taux d'IL-7 évoluent inversement au nombre de cellules T et les valeurs maximales d'IL-7 observées

chez les patients des deux cohortes sont similaires. Au-delà de J+30, les taux d'IL-7 se normalisent pour l'ensemble des receveurs, bien que la reconstitution immunitaire soit encore très balbutiante après conditionnement myéloablatif et plus rapide dans le groupe des conditionnements réduits où deux fois plus de patients ont une lymphocytose supérieure à $1000/\text{mm}^3$ à J+60. Les augmentations des taux d'IL-7 apparaissent donc davantage liées à un déficit de consommation engendré par une lymphopénie majeure, ce qui en accord avec les observations rapportées pour les lymphopénies liées au conditionnement pré-greffe [401]. ou encore dans les déficits immunitaires secondaires des infections à VIH [422, 442].

Contrairement à l'IL-7, l'IL-15 n'est pas corrélée au nombre de cellules T CD3⁺ à J+30, ce qui suggère une régulation des taux de cette cytokine moins dépendante de la lymphocytose T. En revanche, quelque soit le conditionnement, les pics de concentration d'IL-15 sont fortement corrélés aux pics de CRP plasmatique. Les aires sous la courbe de ces deux protéines, meilleur reflet de l'impact global du contexte inflammatoire, sont positivement corrélées entre elles, suggérant une forte dépendance de l'IL-15 au contexte inflammatoire. Nous observons de ce fait des valeurs d'IL-15 au pic à J+14 significativement plus élevées chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif. Cette relation entre l'IL-15 et l'inflammation a été identifiée dans de nombreuses études portant sur des maladies inflammatoires. L'ARN messager de l'IL-15 ainsi que la protéine sont ainsi fortement exprimés dans des biopsies de bronches réalisées chez des patients atteints de sarcoïdose ou de bronchite chronique [483]. On relève également des taux accrus d'IL-15 dans le liquide cébrospinal des patients atteints de maladies neuro-inflammatoires [424, 484] ou au niveau tissulaire dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [485-487].

L'évolution des taux d'IL-15 plasmatiques au-delà de la deuxième semaine de la greffe peut être attribuée à la résolution progressive de l'inflammation mais aussi à la consommation préférentielle de l'IL-15 par les cellules NK, quelque soit le type de conditionnement. Les cellules NK réapparaissent très précocement dans le compartiment circulant et une corrélation inverse entre les taux d'IL-15 et le nombre de cellules NK CD3⁺CD56⁺ est retrouvée quelque soit le type de conditionnement (MA : R= -0,57; P= 0,0007 ; RIC : R= -0,31; P= 0,048). Les cellules NK expriment fortement l'IL-2/15R β , alors qu'elles n'expriment guère le récepteur de l'IL-7 [425, 436].

Le risque de développement d'une GVH aigüe de grade 2-4 chez nos patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (32,5%) et ceux ayant reçu un conditionnement réduit (35,5%) est identique en accord avec plusieurs études publiées [287, 382, 385]. En revanche, le délai de survenue de cette complication est plus tardif dans les conditionnements réduits avec une médiane de 42 jours post-greffe, soit 2 semaines plus tard que dans les conditionnements myéloablatifs, ce qui est conforme aux données de la littérature [288, 332]. Cette variation temporelle est en parfaite adéquation avec les temps prédictifs retrouvés lors des dosages d'IL-7. En effet, dans les conditionnements myéloablatifs, le taux à J+14 apparaît comme un facteur prédictif, tandis que dans

les conditionnements réduits, c'est à J+30 que le taux se révèle critique, en modèle de COX, pour la survenue ultérieure de la GVH aiguë.

L'augmentation des taux d'IL-7 après greffe et sa relation avec le risque de GVH ont été décrites par Mackall et al. [401] dans une étude prospective de patients ayant reçu un conditionnement atténué, avec une valeur prédictive du taux d'IL-7 ciblée sur J+7 [401]. Ce timing différent peut s'expliquer par la nature du traitement pré-greffe administré. Les patients de cette étude avaient, en effet, reçu délibérément un à trois cycles de EPOCH-F, associant de l'étoposide, de la prednisone, de la vincristine, du cyclophosphamide, de la doxorubicine, et de la fludarabine en plus du conditionnement réduit classique composé de fludarabine (30 mg/m²/jour) et de cyclophosphamide (1,200 mg/m²/jour) pendant 4 jours. L'effet recherché était d'obtenir une numération de cellules T CD4⁺ inférieure à 100 cellules/mm³, autrement dit une lymphopénie sévère (inférieure à 100 cellules T/mm³), proche de celle que nous avons observée dans notre cohorte après conditionnement myéloablatif. La médiane de survenue de la GVH aiguë était de 33 jours (étendue : 19-49), soit un délai de survenue de la GVH identique à celui de nos patients recevant un conditionnement myéloablatif. Ainsi, que le conditionnement soit myéloablatif ou réduit, mais très lymphopéniant, une élévation forte de l'IL-7 pilotée par une lymphopénie sévère transitoire, expose à un risque accru de GVH aiguë.

Ces observations réalisées dans le cadre d'études cliniques sont en accord avec les données obtenues dans des modèles expérimentaux murins où l'administration d'IL-7 recombinante à des souris receveuses augmente l'incidence de la GVH aiguë [258, 394]. Lors d'un contact conjoint TCR-antigène cognate [66, 144], l'IL-7 favorise l'expansion des cellules T naïves et mémoires centrales exprimant fortement le CD127. Plusieurs études suggèrent que les populations de cellules T CD4⁺CCR7⁺ ou CD62L (composées de cellules naïves et mémoires centrales) contiennent l'essentiels des précurseurs alloréactifs [313, 462] et jouent un rôle dans le risque de développement de la GVH aiguë.

L'IL-15, par son action directe sur l'expansion des cellules T CD8⁺ mémoires et ses effets contributifs à la prolifération des autres populations T apparaît renforcer l'action de l'IL-7 en potentialisant son rôle dans l'alloréactivité et le développement de la GVH. Cette augmentation de la prolifération des cellules T CD8⁺ par l'IL-15 est soutenue par l'IL-7 qui est capable d'agir de manière synergique pour induire une meilleure expansion [186, 441]. Dans les greffes d'organe solide, des taux élevés d'IL-15 ont été observés chez les receveurs présentant un rejet d'organe. Ainsi, une augmentation de l'IL-15 dans le liquide broncho alvéolaire survient chez des patients présentant un rejet à la suite à une allogreffe de poumon [407]. Une étude de Wang, dans le cadre d'une allogreffe de foie chez le rat met en évidence une élévation de l'ARN ainsi que de la protéine IL-15 dans les biopsies de foie réalisée [409].

Le risque de rechute chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif (25%) et ceux ayant reçu un conditionnement réduit (26,7%) est identique dans nos cohortes. Le risque de rechute ne diffère pas entre donneur familial et donneur non apparenté, conformément à l'expérience Française [313]. Les délais de survenue de cette complication sont également identiques avec une médiane de 132 jours post-greffe (étendue: 82-347) chez les patients avec un conditionnement réduit et une médiane de 140 jours post-greffe (étendue: 50-551) chez les patients recevant un conditionnement myéloablatif. Plusieurs études ont cependant montré que les patients ayant reçu un conditionnement réduit présentaient un risque accru de rechute comparativement au conditionnement myéloablatif. Martino observe chez des patients receveurs de CSH, traités pour des syndromes myélodysplasiques, un taux de rechute à 3 ans post-greffe de 45% dans les conditionnements réduits contre 27%, ($P < 0,01$) dans sa cohorte de patients avec conditionnement standard [463]. Dans une autre étude de 141 patients traités pour un lymphome, le risque de rechute est également plus faible pour les conditionnements myéloablatifs (RIC= 36% versus MA= 11%, $P < 0,01$) [392]. Cette différence peut être liée à un nombre de patients inclus plus faible dans notre cohorte ainsi qu'une médiane de suivi plus courte.

Dans les conditionnements réduits, nous ne retrouvons pas de corrélation entre les taux précoces de cytokines homéostatiques et le risque de rechute. Seuls les taux d'IL-7 et d'IL-15 à J+90 post-greffe sont inversement corrélés au risque de rechute ($R = -0,476$, $P = 0,003$; $R = -0,330$, $P = 0,004$ respectivement). Ces taux retrouvés nous apportent un élément explicatif de la physiopathologie de la rechute mais ne peuvent être utilisés à titre prédictif puisque ces prélèvements ont lieu pour certains patients lors des premières manifestations de l'échec de la greffe.

Chez les patients avec un conditionnement myéloablatif, de faibles taux d'IL-15 à J+14 sont associés en analyse univariée et multivariée avec un risque de développement de la rechute. Les taux faibles d'IL-7 ne sont pas significativement corrélés à la rechute, mais il existe une tendance. Les taux plus faibles d'IL-15 chez les patients ne rechutant pas suggèrent que celle-ci a été précocement consommée par les cellules présentant une préférence pour IL-15, à savoir les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. L'IL-15 agissant comme un facteur de prolifération et de différenciation des populations T CD8 et NK [185, 204], permettrait une bonne reconstitution de ces populations lors des premiers mois post-greffe [472], protégeant ainsi du risque de rechute par le développement d'effecteurs anti-tumoraux. En effet, il a été montré qu'une faible reconstitution des cellules effectrices T CD8⁺CD28⁻ mémoires, au cours des deux premiers mois post-greffe, était corrélée à un risque élevé de rechute [464]. L'IL-15 potentialise la réponse anti-tumorale [465, 466], en favorisant la différenciation des cellules T CD8⁺ naïves en cellules T cytotoxiques [467] et la production d'IFN- γ et de perforine par les cellules T CD8⁺ [468, 469]. Les cellules NK peuvent également exercer une action protectrice anti-tumorale dans le cadre de maladies touchant les lignées cellulaires myéloïdes [470]. L'équipe de Chen montre que les cellules NK du donneur, stimulées en présence d'IL-15 et infusées chez le receveur, peuvent diminuer le risque de rechute [471]. Le rôle de l'IL-15 dans la rechute n'avait encore jamais été évalué chez l'Homme.

Au cours des premiers mois, chez ces patients adultes, c'est l'expansion homéostatique des cellules T matures qui est l'élément moteur essentiel au repeuplement du CPLT. Comme attendu, au-delà de J30, la majorité des cellules T sont de phénotype mémoire, en accord avec le changement phénotypique provoqué par la prolifération homéostatique et, dans les deux types de conditionnement étudiés, le compartiment lymphocytaire T périphérique est alors composé à 80% de cellules mémoires, majoritairement de type CD8. De manière surprenante, notre analyse montre une inversion CD4/CD8^{hi} plus tardive après conditionnement atténué. L'expansion T CD8⁺ n'est effective qu'au deuxième mois post-greffe, tandis que dès J30 les receveurs de conditionnements myéloablatifs ont inversé l'équilibre entre leurs populations T majeures CD4 et CD8. Quelque soit le conditionnement reçu par nos receveurs, il n'y a pas eu a priori de différence quantitative ni qualitative en ce qui concerne les lymphocytes T du donneur apportés par le greffon. En revanche, un contingent de cellules T du receveur peut persister après certains conditionnements atténués. Ces cellules T résiduelles du receveur sont détectées à J0 plus fréquemment chez les receveurs avec un conditionnement de type Seattle. L'existence d'un pool de cellules T initial plus important peut contribuer à une correction plus rapide de la lymphopénie avec alors un chimérisme partiel mais elle ne peut expliquer à elle seule l'inversion décalée de 3 à 4 semaines du rapport CD4/CD8 après conditionnement atténué.

Nous savons que le degré d'exposition aux cytokines homéostatiques est capable d'influencer la cinétique et la nature des populations impliquées dans la reconstitution immunitaire. Même si d'importantes variations interindividuelles existent, les taux d'IL-7 mesurés pour l'ensemble de nos receveurs montrent une cinétique plasmatique de l'IL-7 et une exposition évaluée par le calcul des aires sous la courbe globalement superposable. Il existe néanmoins une élévation retardée de l'IL-7 pour les receveurs du groupe RIC 1 dont le taux d'IL-7 repéré à J14 est significativement plus faible que celui du groupe RIC 2.

En revanche, dans le cas de l'IL-15, nous dégageons des cinétiques différentes selon le type de conditionnement. Ainsi, l'exposition globale des cellules T à l'IL-15 est d'emblée majeure en cas de conditionnement myéloablatif ou de type RIC 2 mais réduite de moitié en cas de type RIC 1. Cette différence pourrait être à l'origine de l'expansion plus rapide des cellules T CD8⁺ observée après conditionnement myéloablatif. L'IL-15 agit de manière élective sur les cellules T CD8⁺ mémoires et est capable d'induire à elle-seule leur prolifération. Ainsi, dès la première semaine post-greffe, une exposition intense à l'IL-15 permet une forte expansion T CD8⁺ et une inversion précoce du rapport CD4/CD8. Cette expansion CD8 préférentielle est ensuite renforcée par la réceptivité des cellules T CD8⁺ memory-like issues de l'expansion homéostatique des cellules T CD8⁺ naïves pilotée par les interactions TCR/peptide du soi-CMH et l'IL-7 tandis que l'expansion des cellules T CD4⁺ est entravée.

En conclusion, ces deux études prospectives indiquent que l'IL-7 et l'IL-15 présentent d'importantes variations plasmatiques interindividuelles au cours des premières semaines post allogreffe de CSH. Les taux d'IL-7 sont fortement influencés par la lymphopénie. Les taux d'IL-15 sont corrélés à l'intensité de contexte inflammatoire avec une corrélation forte avec les taux de CRP. Cependant, la seule détermination de la concentration en CRP n'est pas suffisante pour prédire la survenue d'une GVH aiguë dans nos études. Quelque soit le conditionnement pré-greffe, l'IL-7 conserve une valeur prédictive pour le risque de GVH aiguë. L'association entre l'élévation des taux d'IL-7, le développement, la sévérité et la précocité de la GVH aiguë suggère qu'une détermination des taux plasmatiques d'IL-7 dans les semaines qui suivent la greffe pourrait aider à prédire le risque de survenue de la complication et montre qu'un traitement basé sur l'administration d'IL-7 recombinant dans le but d'améliorer la reconstitution immunitaire présente des limites et peut renforcer le risque de GVH aiguë [399].

BIBLIOGRAPHIE

1. Arstila, T.P., et al., *A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity*. Science, 1999. **286**(5441): p. 958-61.
2. Robins, H.S., et al., *Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4099-107.
3. Wills, M.R., et al., *Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45ROhigh to CD45RAhigh in vivo: CD45RAhighCD8+ T cells comprise both naive and memory cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7080-7.
4. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
5. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
6. Beilhack, A., et al., *In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1113-22.
7. Amyes, E., A.J. McMichael, and M.F. Callan, *Human CD4+ T cells are predominantly distributed among six phenotypically and functionally distinct subsets*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5765-73.
8. Villegas, E.N., et al., *Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3344-53.
9. Suresh, M., et al., *Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5565-73.
10. Hendriks, J., et al., *CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 433-40.
11. Song, K., et al., *Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 7916-21.
12. Saule, P., et al., *Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(3): p. 274-81.
13. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
14. Kim, S.H., et al., *The persistence of humoral and cellular immunities more than three decades after smallpox vaccination*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(1): p. 91-3.
15. Messi, M., et al., *Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 78-86.
16. Rufer, N., et al., *Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1779-87.
17. Takata, H. and M. Takiguchi, *Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4330-40.
18. van Lier, R.A., I.J. ten Berge, and L.E. Gamadia, *Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 931-9.
19. Ellefsen, K., et al., *Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections*. Eur J Immunol, 2002. **32**(12): p. 3756-64.
20. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.

21. Guarda, G., et al., *L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(7): p. 743-52.
22. Martin-Fontecha, A., et al., *CD40L+ CD4+ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming*. J Exp Med, 2008. **205**(11): p. 2561-74.
23. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
24. Ebert, L.M., P. Schaerli, and B. Moser, *Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 799-809.
25. Macallan, D.C., et al., *Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 255-60.
26. Wallace, D.L., et al., *Direct measurement of T cell subset kinetics in vivo in elderly men and women*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1787-94.
27. Franceschi, C., et al., *The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 12-6.
28. Cossarizza, A., et al., *CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory*. Mech Ageing Dev, 1996. **86**(3): p. 173-95.
29. Nasi, M., et al., *Thymic output and functionality of the IL-7/IL-7 receptor system in centenarians: implications for the neolymphogenesis at the limit of human life*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 167-75.
30. McIntire, K.R., S. Sell, and J.F. Miller, *Pathogenesis of the Post-Neonatal Thymectomy Wasting Syndrome*. Nature, 1964. **204**: p. 151-5.
31. Parrott, D.M. and J. East, *Role of the thymus in neonatal life*. Nature, 1962. **195**: p. 347-8.
32. Berzins, S.P., R.L. Boyd, and J.F. Miller, *The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool*. J Exp Med, 1998. **187**(11): p. 1839-48.
33. Mackall, C.L. and R.E. Gress, *Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy*. Immunol Rev, 1997. **157**: p. 61-72.
34. Rocha, B., P. Vassalli, and D. Guy-Grand, *The extrathymic T-cell development pathway*. Immunol Today, 1992. **13**(11): p. 449-54.
35. Rocha, B., N. Dautigny, and P. Pereira, *Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 905-11.
36. Mackall, C.L., et al., *Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4609-16.
37. La Gruta, N.L., I.R. Driel, and P.A. Gleeson, *Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3380-6.
38. Freitas, A.A., F. Agenes, and G.C. Coutinho, *Cellular competition modulates survival and selection of CD8+ T cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2640-9.
39. Dulude, G., D.C. Roy, and C. Perreault, *The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1329-42.
40. Mackall, C.L., et al., *T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny*. Blood, 1993. **82**(8): p. 2585-94.

41. Tanchot, C. and B. Rocha, *The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools*. Eur J Immunol, 1995. **25**(8): p. 2127-36.
42. Jameson, S.C., *Maintaining the norm: T-cell homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 547-56.
43. Goldrath, A.W., L.Y. Bogatzki, and M.J. Bevan, *Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 557-64.
44. Murali-Krishna, K. and R. Ahmed, *Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1733-7.
45. Bourgeois, C., G. Kassiotis, and B. Stockinger, *A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5316-23.
46. Min, B., et al., *Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3874-9.
47. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: challenges for the future*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35 Suppl 1**: p. S53-7.
48. Hazenberg, M.D., et al., *T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3449-53.
49. Roux, E., et al., *Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2299-303.
50. Hakim, F.T., et al., *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 930-9.
51. Klein, A.K., et al., *T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2001. **7**(8): p. 454-66.
52. Heitger, A., et al., *Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation*. Blood, 1997. **90**(2): p. 850-7.
53. Lewin, S.R., et al., *Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2235-42.
54. Godthelp, B.C., et al., *Incomplete T-cell immune reconstitution in two major histocompatibility complex class II-deficiency/bare lymphocyte syndrome patients after HLA-identical sibling bone marrow transplantation*. Blood, 1999. **94**(1): p. 348-58.
55. Kohler, S. and A. Thiel, *Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets*. Blood, 2009. **113**(4): p. 769-74.
56. Azevedo, R.I., et al., *IL-7 sustains CD31 expression in human naive CD4+ T cells and preferentially expands the CD31+ subset in a PI3K-dependent manner*. Blood, 2009. **113**(13): p. 2999-3007.
57. Mackall, C.L., et al., *Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy*. N Engl J Med, 1995. **332**(3): p. 143-9.
58. de Vries, E., et al., *Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(3): p. 267-75.
59. Sarzotti, M., et al., *T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2711-8.
60. Mackall, C.L., et al., *Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3700-7.

61. Douek, D.C., et al., *Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution*. *Lancet*, 2000. **355**(9218): p. 1875-81.
62. Storek, J., et al., *Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation*. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3380-9.
63. Poulin, J.F., et al., *Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease*. *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4600-7.
64. Nordoy, T., et al., *Persistent changes in the immune system 4-10 years after ABMT*. *Bone Marrow Transplant*, 1999. **24**(8): p. 873-8.
65. Kilpatrick, R.D., et al., *Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging*. *J Immunol*, 2008. **180**(3): p. 1499-507.
66. Williams, K.M., F.T. Hakim, and R.E. Gress, *T cell immune reconstitution following lymphodepletion*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(5): p. 318-30.
67. Dumont-Girard, F., et al., *Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants*. *Blood*, 1998. **92**(11): p. 4464-71.
68. Nyga, R., et al., *Activated STAT5 proteins induce activation of the PI 3-kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab2 scaffolding adapter*. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 359-66.
69. Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard, *New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(7): p. 480-90.
70. Macchi, P., et al., *Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID)*. *Nature*, 1995. **377**(6544): p. 65-8.
71. Russell, S.M., et al., *Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development*. *Science*, 1995. **270**(5237): p. 797-800.
72. Reche, P.A., et al., *Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 336-43.
73. Wang, X., et al., *Structural biology of shared cytokine receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 29-60.
74. Namen, A.E., et al., *Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7*. *Nature*, 1988. **333**(6173): p. 571-3.
75. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. *Science*, 1993. **262**(5141): p. 1877-80.
76. Lai, S.Y., J. Molden, and M.A. Goldsmith, *Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(2): p. 169-77.
77. Puel, A., et al., *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. *Nat Genet*, 1998. **20**(4): p. 394-7.
78. Maki, K., et al., *Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(14): p. 7172-7.
79. Sutherland, G.R., et al., *The gene for human interleukin 7 (IL7) is at 8q12-13*. *Hum Genet*, 1989. **82**(4): p. 371-2.
80. Goodwin, R.G., et al., *Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(1): p. 302-6.
81. Vudattu, N.K., et al., *Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants*. *Genes Immun*, 2009. **10**(2): p. 132-40.
82. McElroy, C.A., J.A. Dohm, and S.T. Walsh, *Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7Ralpha complex*. *Structure*, 2009. **17**(1): p. 54-65.
83. Michaelson, M.D., et al., *Interleukin-7 is trophic for embryonic neurons and is expressed in developing brain*. *Dev Biol*, 1996. **179**(1): p. 251-63.

84. Ariel, A., et al., *Induction of T cell adhesion to extracellular matrix or endothelial cell ligands by soluble or matrix-bound interleukin-7*. Eur J Immunol, 1997. **27**(10): p. 2562-70.
85. Tokoyoda, K., et al., *Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 721-30.
86. Link, A., et al., *Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1255-65.
87. Takada, K. and S.C. Jameson, *Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 823-32.
88. Churchman, S.M. and F. Ponchel, *Interleukin-7 in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(6): p. 753-9.
89. Fukatsu, K., et al., *Exogenous interleukin 7 affects gut-associated lymphoid tissue in mice receiving total parenteral nutrition*. Shock, 2005. **24**(6): p. 541-6.
90. Lee, S.K. and C.D. Surh, *Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 169-80.
91. Mazzucchelli, R. and S.K. Durum, *Interleukin-7 receptor expression: intelligent design*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 144-54.
92. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
93. Sorg, R.V., et al., *Human dendritic cells express functional interleukin-7*. Immunobiology, 1998. **198**(5): p. 514-26.
94. Guimond, M., et al., *Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 149-57.
95. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6571-6.
96. Thiant, S., et al., *Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse*. Bone Marrow Transplant.
97. Bolotin, E., et al., *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
98. Tang, J., et al., *TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 117-25.
99. Miller, A.R., et al., *Transduction of human melanoma cell lines with the human interleukin-7 gene using retroviral-mediated gene transfer: comparison of immunologic properties with interleukin-2*. Blood, 1993. **82**(12): p. 3686-94.
100. Lynch, M., et al., *The interleukin-7 receptor gene is at 5p13*. Hum Genet, 1992. **89**(5): p. 566-8.
101. Goodwin, R.G., et al., *Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily*. Cell, 1990. **60**(6): p. 941-51.
102. Gregory, S.G., et al., *Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1083-91.
103. Rane, L., et al., *Alternative splicing of interleukin-7 (IL-7) and interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis (MS)*. J Neuroimmunol. **222**(1-2): p. 82-6.
104. Hoe, E., et al., *Functionally significant differences in expression of disease-associated IL-7 receptor alpha haplotypes in CD4 T cells and dendritic cells*. J Immunol. **184**(5): p. 2512-7.
105. Alves, N.L., et al., *A new subset of human naive CD8+ T cells defined by low expression of IL-7R alpha*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 221-8.

106. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
107. Lu, N., et al., *TSLP and IL-7 use two different mechanisms to regulate human CD4+ T cell homeostasis*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2111-9.
108. Pillai, M., B. Torok-Storb, and M. Iwata, *Expression and function of IL-7 receptors in marrow stromal cells*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(12): p. 2403-8.
109. Capitini, C.M., A.A. Chisti, and C.L. Mackall, *Modulating T-cell homeostasis with IL-7: preclinical and clinical studies*. J Intern Med, 2009. **266**(2): p. 141-53.
110. Krawczyński, A., C. Kieda, and D. Dus, *The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(6): p. 518-25.
111. Palmer, M.J., et al., *Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective*. Cell Mol Immunol, 2008. **5**(2): p. 79-89.
112. Crawley, J.B., J. Willcocks, and B.M. Foxwell, *Interleukin-7 induces T cell proliferation in the absence of Erk/MAP kinase activity*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2717-23.
113. Jiang, Q., et al., *Role of the intracellular domain of IL-7 receptor in T cell development*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 228-34.
114. Kittipatarin, C. and A.R. Khaled, *Interlinking interleukin-7*. Cytokine, 2007. **39**(1): p. 75-83.
115. Akashi, K., et al., *Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1033-41.
116. Maraskovsky, E., et al., *Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1-/- mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1011-9.
117. Pellegrini, M., et al., *Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 2004. **200**(9): p. 1189-95.
118. Wofford, J.A., et al., *IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2101-11.
119. Chehtane, M. and A.R. Khaled, *Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene*. Am J Physiol Cell Physiol. **298**(6): p. C1560-71.
120. Burgering, B.M., *A brief introduction to FOXOlogy*. Oncogene, 2008. **27**(16): p. 2258-62.
121. Kerdiles, Y.M., et al., *Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 176-84.
122. Carlson, C.M., et al., *Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 299-302.
123. Beq, S., et al., *Injection of glycosylated recombinant simian IL-7 provokes rapid and massive T-cell homing in rhesus macaques*. Blood, 2009. **114**(4): p. 816-25.
124. Ouyang, W., et al., *An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance*. Immunity, 2009. **30**(3): p. 358-71.
125. Yang, Y., J. An, and N.P. Weng, *Telomerase is involved in IL-7-mediated differential survival of naive and memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3775-81.
126. Wallace, D.L., et al., *Prolonged exposure of naive CD8+ T cells to interleukin-7 or interleukin-15 stimulates proliferation without differentiation or loss of telomere length*. Immunology, 2006. **119**(2): p. 243-53.
127. Ziegler, S.F. and Y.J. Liu, *Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 709-14.

128. van Roon, J.A., et al., *Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66**(5): p. 664-9.
129. Liu, X., et al., *Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease*. *Nat Med*. **16**(2): p. 191-7.
130. Rose, T., et al., *Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response*. *J Biol Chem*. **285**(20): p. 14898-908.
131. Page, T.H., et al., *Association of the common gamma-chain with the human IL-7 receptor is modulated by T cell activation*. *J Immunol*, 1997. **158**(12): p. 5727-35.
132. Lozza, L., et al., *The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(1): p. 30-9.
133. Smyth, C.M., et al., *Limiting γ c expression differentially affects signaling via the interleukin (IL)-7 and IL-15 receptors*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 91-8.
134. Kemp, R.A., et al., *Evidence of STAT5-dependent and -independent routes to CD8 memory formation and a preferential role for IL-7 over IL-15 in STAT5 activation*. *Immunol Cell Biol*. **88**(2): p. 213-9.
135. Lin, J.X., et al., *The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15*. *Immunity*, 1995. **2**(4): p. 331-9.
136. Ramanathan, S., et al., *Suppressor of cytokine signaling 1 stringently regulates distinct functions of IL-7 and IL-15 in vivo during T lymphocyte development and homeostasis*. *J Immunol*, 2006. **176**(7): p. 4029-41.
137. Park, J.H., et al., *Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 289-302.
138. Benoit, A., et al., *Inverse association of repressor growth factor independent-1 with CD8 T cell interleukin (IL)-7 receptor [alpha] expression and limited signal transducers and activators of transcription signaling in response to IL-7 among γ -chain cytokines in HIV patients*. *Aids*, 2009. **23**(11): p. 1341-7.
139. Henriques, C.M., et al., *IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7Ralpha in T cells*. *Blood*. **115**(16): p. 3269-77.
140. Xue, H.H., et al., *IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13759-64.
141. Alves, N.L., et al., *Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling*. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5201-10.
142. Kaech, S.M., et al., *Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(12): p. 1191-8.
143. Swainson, L., et al., *IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes*. *J Immunol*, 2006. **176**(11): p. 6702-8.
144. Sportes, C., et al., *Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets*. *J Exp Med*, 2008. **205**(7): p. 1701-14.
145. Lundmark, F., et al., *Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis*. *Nat Genet*, 2007. **39**(9): p. 1108-13.
146. Pleiman, C.M., et al., *Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(6): p. 3052-9.

147. Sitnicka, E., et al., *Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1495-506.
148. Weekx, S.F., et al., *Generation of T cells from adult human hematopoietic stem cells and progenitors in a fetal thymic organ culture system: stimulation by tumor necrosis factor-alpha*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2806-12.
149. Wolf, K., et al., *Tumour necrosis factor-alpha induced CD70 and interleukin-7R mRNA expression in BEAS-2B cells*. Eur Respir J, 2002. **20**(2): p. 369-75.
150. Franchimont, D., et al., *Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2212-8.
151. Lee, H.C., et al., *Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7800-6.
152. Shibata, H., et al., *Induction of the IL-7 receptor alpha chain in mouse peripheral B cells by glucocorticoids*. Immunol Lett, 2007. **111**(1): p. 45-50.
153. Judge, A.D., et al., *Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 935-46.
154. Giri, J.G., et al., *Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15*. Embo J, 1994. **13**(12): p. 2822-30.
155. Grabstein, K.H., et al., *Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor*. Science, 1994. **264**(5161): p. 965-8.
156. Budagian, V., et al., *IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(4): p. 259-80.
157. Kurys, G., et al., *The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15*. J Biol Chem, 2000. **275**(39): p. 30653-9.
158. Bergamaschi, C., et al., *Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo*. J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3064-72.
159. Musso, T., et al., *Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3531-9.
160. Budagian, V., et al., *Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42192-201.
161. Chirifu, M., et al., *Crystal structure of the IL-15-IL-15Ralpha complex, a cytokine-receptor unit presented in trans*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 1001-7.
162. Anderson, D.M., et al., *Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes*. J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29862-9.
163. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1179-87.
164. Dubois, S.P., T.A. Waldmann, and J.R. Muller, *Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8662-7.
165. Dubois, S., et al., *Natural splicing of exon 2 of human interleukin-15 receptor alpha-chain mRNA results in a shortened form with a distinct pattern of expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26978-84.
166. Bouchaud, G., et al., *The exon-3-encoded domain of IL-15Ralpha contributes to IL-15 high-affinity binding and is crucial for the IL-15 antagonistic effect of soluble IL-15Ralpha*. J Mol Biol, 2008. **382**(1): p. 1-12.
167. Lodolce, J.P., et al., *IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 669-76.
168. Kennedy, M.K., et al., *Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 771-80.

169. Burkett, P.R., et al., *Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis*. J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 825-34.
170. Schluns, K.S. and L. Lefrancois, *Cytokine control of memory T-cell development and survival*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 269-79.
171. Sandau, M.M., et al., *Cutting edge: transpresentation of IL-15 by bone marrow-derived cells necessitates expression of IL-15 and IL-15R alpha by the same cells*. J Immunol, 2004. **173**(11): p. 6537-41.
172. Lodolce, J.P., et al., *T cell-independent interleukin 15Ralpha signals are required for bystander proliferation*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1187-94.
173. Dubois, S., et al., *IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 537-47.
174. Mortier, E., et al., *IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1213-25.
175. Bergamaschi, C., et al., *Intracellular interaction of interleukin-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4189-99.
176. Wu, Z., et al., *The IL-15 receptor {alpha} chain cytoplasmic domain is critical for normal IL-15Ralpha function but is not required for trans-presentation*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4411-9.
177. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 595-601.
178. Sato, N., et al., *The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 588-93.
179. Stonier, S.W., et al., *Dendritic cells drive memory CD8 T-cell homeostasis via IL-15 transpresentation*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4546-54.
180. Fehniger, T.A., et al., *Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 219-31.
181. Mortier, E., et al., *Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 811-22.
182. Bulfone-Paus, S., et al., *The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling*. Bioessays, 2006. **28**(4): p. 362-77.
183. Olsen, S.K., et al., *Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37191-204.
184. Ota, N., et al., *No Requirement of Trans Presentations of IL-15 for Human CD8 T Cell Proliferation*. J Immunol.
185. Alves, N.L., et al., *IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2541-6.
186. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4260-6.
187. Mortier, E., et al., *Natural, proteolytic release of a soluble form of human IL-15 receptor alpha-chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1681-8.
188. Bulanova, E., et al., *Soluble Interleukin IL-15Ralpha is generated by alternative splicing or proteolytic cleavage and forms functional complexes with IL-15*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13167-79.

189. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15*. *Immunity*, 1998. **8**(5): p. 591-9.
190. Lamana, A., et al., *Characterization of serum interleukin-15 in healthy volunteers and patients with early arthritis to assess its potential use as a biomarker*. *Eur Cytokine Netw.* **21**(3): p. 186-94.
191. Li, Y., et al., *IL-15 activates telomerase and minimizes telomere loss and may preserve the replicative life span of memory CD8⁺ T cells in vitro*. *J Immunol*, 2005. **174**(7): p. 4019-24.
192. Hand, T.W., et al., *Differential effects of STAT5 and PI3K/AKT signaling on effector and memory CD8 T-cell survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(38): p. 16601-6.
193. Mohamadzadeh, M., et al., *Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(7): p. 1013-20.
194. Ruckert, R., et al., *Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(12): p. 3493-503.
195. Pulendran, B., et al., *Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8⁺ Tc1 responses in vivo*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(1): p. 66-73.
196. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 183-90.
197. Boyman, O., et al., *Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(8): p. 2088-94.
198. Surh, C.D. and J. Sprent, *Regulation of naive and memory T-cell homeostasis*. *Microbes Infect*, 2002. **4**(1): p. 51-6.
199. Vivien, L., C. Benoist, and D. Mathis, *T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo*. *Int Immunol*, 2001. **13**(6): p. 763-8.
200. Kondrack, R.M., et al., *Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1797-806.
201. Morrissey, P.J., et al., *Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation*. *J Immunol*, 1991. **146**(5): p. 1547-52.
202. Grabstein, K.H., et al., *Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 257-64.
203. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8732-7.
204. Sandau, M.M., C.J. Winstead, and S.C. Jameson, *IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 120-5.
205. Ernst, B., et al., *The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 173-81.
206. Troy, A.E. and H. Shen, *Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition*. *J Immunol*, 2003. **170**(2): p. 672-6.
207. Hataye, J., et al., *Naive and memory CD4⁺ T cell survival controlled by clonal abundance*. *Science*, 2006. **312**(5770): p. 114-6.
208. Seddon, B. and R. Zamoyska, *TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of naive T cells*. *J Immunol*, 2002. **169**(7): p. 3752-9.
209. Ge, Q., et al., *Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(4): p. 1728-33.

210. Viret, C., F.S. Wong, and C.A. Janeway, Jr., *Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition*. *Immunity*, 1999. **10**(5): p. 559-68.
211. Kassiotis, G., R. Zamoyska, and B. Stockinger, *Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells*. *J Exp Med*, 2003. **197**(8): p. 1007-16.
212. Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh, *A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis*. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 40-4.
213. Smith, K., et al., *Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(9): p. 1253-61.
214. Schonland, S.O., et al., *Homeostatic control of T-cell generation in neonates*. *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1428-34.
215. Haluszczak, C., et al., *The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion*. *J Exp Med*, 2009. **206**(2): p. 435-48.
216. Sharma, D., et al., *Spatial distribution, kinetics, signaling and cytokine production during homeostasis driven proliferation of CD4+ T cells*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(11-12): p. 2403-12.
217. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger, *Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 163-71.
218. Tanchot, C., et al., *Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells*. *Science*, 1997. **276**(5321): p. 2057-62.
219. Murali-Krishna, K., et al., *Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1377-81.
220. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston, *Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1381-3.
221. Tan, J.T., et al., *Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(12): p. 1523-32.
222. Polic, B., et al., *How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(15): p. 8744-9.
223. De Riva, A., et al., *Noncognate interaction with MHC class II molecules is essential for maintenance of T cell metabolism to establish optimal memory CD4 T cell function*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5488-95.
224. Seddon, B., P. Tomlinson, and R. Zamoyska, *Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(7): p. 680-6.
225. Kassiotis, G., et al., *Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 244-50.
226. Bushar, N.D., et al., *Ablation of SLP-76 signaling after T cell priming generates memory CD4 T cells impaired in steady-state and cytokine-driven homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(2): p. 827-31.
227. Kieper, W.C., et al., *Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion*. *J Immunol*, 2005. **174**(6): p. 3158-63.
228. Lenz, D.C., et al., *IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(25): p. 9357-62.
229. Purton, J.F., et al., *Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 951-61.
230. Riou, C., et al., *Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 79-91.

231. Kim, H.R., K.A. Hwang, and I. Kang, *Dual roles of IL-15 in maintaining IL-7RalphalowCCR7- memory CD8+ T cells in humans via recovering the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6734-40.
232. Kieper, W.C., et al., *Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1533-9.
233. Kassiotis, G. and B. Stockinger, *Anatomical heterogeneity of memory CD4+ T cells due to reversible adaptation to the microenvironment*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7292-8.
234. Moyron-Quiroz, J.E., et al., *Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs*. Immunity, 2006. **25**(4): p. 643-54.
235. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
236. Goldrath, A.W., et al., *Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1515-22.
237. Carrio, R., C.E. Rolle, and T.R. Malek, *Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3078-88.
238. Peggs, K.S., et al., *Reconstitution of T-cell repertoire after autologous stem cell transplantation: influence of CD34 selection and cytomegalovirus infection*. Biol Blood Marrow Transplant, 2003. **9**(3): p. 198-205.
239. Dooms, H. and A.K. Abbas, *Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 23-38.
240. Cho, J.H., et al., *An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1787-801.
241. Datta, S. and N.E. Sarvetnick, *IL-21 limits peripheral lymphocyte numbers through T cell homeostatic mechanisms*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3118.
242. Zeng, R., et al., *Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 139-48.
243. Gagnon, J., et al., *IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 7958-68.
244. Ferrari-Lacraz, S., et al., *IL-21 promotes survival and maintains a naive phenotype in human CD4+ T lymphocytes*. Int Immunol, 2008. **20**(8): p. 1009-18.
245. Nguyen, H. and N.P. Weng, *IL-21 preferentially enhances IL-15-mediated homeostatic proliferation of human CD28+ CD8 memory T cells throughout the adult age span*. J Leukoc Biol. **87**(1): p. 43-9.
246. Alves, N.L., F.A. Arosa, and R.A. van Lier, *IL-21 sustains CD28 expression on IL-15-activated human naive CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 755-62.
247. Al-Shami, A., et al., *A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 159-68.
248. Chappaz, S., et al., *Increased TSLP availability restores T- and B-cell compartments in adult IL-7 deficient mice*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3862-70.
249. Rochman, Y. and W.J. Leonard, *The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7699-705.
250. Rochman, I., et al., *Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6720-4.
251. Watanabe, N., et al., *Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion*. Nat Immunol, 2004. **5**(4): p. 426-34.
252. Intlekofer, A.M., et al., *Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1236-44.

253. Ploix, C., D. Lo, and M.J. Carson, *A ligand for the chemokine receptor CCR7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6724-30.
254. Lucas, P.J., et al., *Dysregulation of IL-15-mediated T-cell homeostasis in TGF-beta dominant-negative receptor transgenic mice*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2789-95.
255. Shen, S., et al., *Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3517-26.
256. Yates, A., et al., *Mathematical modeling reveals the biological program regulating lymphopenia-induced proliferation*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1414-22.
257. Pourgheysari, B., et al., *The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire*. Blood. **116**(16): p. 2968-74.
258. Sinha, M.L., et al., *Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2642-9.
259. Blaser, B.W., et al., *Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(2): p. 894-901.
260. Moxham, V.F., et al., *Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3910-8.
261. Baccala, R., et al., *Tumor immunity via homeostatic T cell proliferation: mechanistic aspects and clinical perspectives*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **27**(1): p. 75-85.
262. Brown, I.E., et al., *Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8+ T cell anergy and promotes tumor rejection*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4521-9.
263. Le Campion, A., et al., *Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1784-93.
264. Le Saout, C., et al., *Memory-like CD8+ and CD4+ T cells cooperate to break peripheral tolerance under lymphopenic conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19414-9.
265. Daikeler, T. and A. Tyndall, *Autoimmunity following haematopoietic stem-cell transplantation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(2): p. 349-60.
266. Managlia, E.Z., A. Landay, and L. Al-Harthi, *Interleukin-7 signalling is sufficient to phenotypically and functionally prime human CD4 naive T cells*. Immunology, 2005. **114**(3): p. 322-35.
267. Urbano-Ispizua, A., et al., *The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings*. Blood, 2001. **97**(2): p. 383-7.
268. Jung, Y.O., et al., *Toll-like receptor 2 and 4 combination engagement upregulate IL-15 synergistically in human rheumatoid synovial fibroblasts*. Immunol Lett, 2007. **109**(1): p. 21-7.
269. D'Acquisto, F., F. Maione, and M. Pederzoli-Ribeil, *From IL-15 to IL-33: the never-ending list of new players in inflammation. Is it time to forget the humble aspirin and move ahead?* Biochem Pharmacol. **79**(4): p. 525-34.
270. Hamilton, S.E., et al., *The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 475-81.
271. Horne, P.H., et al., *Disparate primary and secondary allospecific CD8+ T cell cytolytic effector function in the presence or absence of host CD4+ T cells*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 80-8.
272. Zorn, E., et al., *Infusion of CD4+ donor lymphocytes induces the expansion of CD8+ donor T cells with cytolytic activity directed against recipient hematopoietic cells*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2052-60.

273. Rosenberg, S.A., et al., *IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells*. J Immunother, 2006. **29**(3): p. 313-9.
274. Thomas, E.D., et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med, 1957. **257**(11): p. 491-6.
275. Mathe, G., et al., *Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results*. Cancer Res, 1965. **25**(9): p. 1525-31.
276. Barnes, D.W., et al., *Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication*. Br Med J, 1956. **2**(4993): p. 626-7.
277. Billingham, R.E., *The biology of graft-versus-host reactions*. Harvey Lect, 1966. **62**: p. 21-78.
278. Przepiorka, D., et al., *1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading*. Bone Marrow Transplant, 1995. **15**(6): p. 825-8.
279. Yakoub-Agha, I., et al., *A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy*. Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1557-65.
280. Kansu, E., *The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2004. **79**(3): p. 209-15.
281. Tivol, E., R. Komorowski, and W.R. Drobyski, *Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(12): p. 4885-91.
282. Sakoda, Y., et al., *Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1756-64.
283. van den Brink, M.R., et al., *Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity*. Transplantation, 2000. **69**(3): p. 446-9.
284. Weinberg, K., et al., *Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1458-66.
285. Teshima, T., et al., *Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease*. Blood, 2003. **102**(2): p. 429-35.
286. Zorn, E., et al., *Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2903-11.
287. Mielcarek, M., et al., *Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2003. **102**(2): p. 756-62.
288. Mielcarek, M. and R. Storb, *Graft-vs-host disease after non-myeloablative hematopoietic cell transplantation*. Leuk Lymphoma, 2005. **46**(9): p. 1251-60.
289. Barrett, A.J., *Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect*. Br J Haematol, 2008. **142**(6): p. 877-88.
290. Ferrara, J.L., K.R. Cooke, and T. Teshima, *The pathophysiology of acute graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2003. **78**(3): p. 181-7.
291. Morris, E.S. and G.R. Hill, *Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 2007. **137**(1): p. 3-19.
292. Mohty, M. and B. Gaugler, *Inflammatory cytokines and dendritic cells in acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 53-63.
293. Rocha, V., et al., *Influence of bone marrow graft lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants*. Exp Hematol, 2001. **29**(11): p. 1347-52.
294. Mohty, M., et al., *CD8+ T cell dose affects development of acute graft-vs-host disease following reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Exp Hematol, 2004. **32**(11): p. 1097-102.

295. Cao, T.M., et al., *Engraftment and survival following reduced-intensity allogeneic peripheral blood hematopoietic cell transplantation is affected by CD8+ T-cell dose*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2300-6.
296. Chang, Y.J., et al., *Expression of CD62L on donor CD4(+) T cells in allografts: correlation with graft-versus-host disease after unmanipulated allogeneic blood and marrow transplantation*. J Clin Immunol, 2009. **29**(5): p. 696-704.
297. Lu, Y. and E.K. Waller, *Dichotomous role of interferon-gamma in allogeneic bone marrow transplant*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(11): p. 1347-53.
298. Wang, H., et al., *Paradoxical effects of IFN-gamma in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3612-9.
299. Yang, K., et al., *[Effect of donor CD4+CD25+ regulatory T cells on hematopoietic and immune reconstitution, GVHD and disease-free survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008. **28**(4): p. 537-41.
300. Wolf, D., et al., *Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation*. Transplantation, 2007. **83**(8): p. 1107-13.
301. Kohrt, H.E., et al., *TLI and ATG conditioning with low risk of graft-versus-host disease retains antitumor reactions after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors*. Blood, 2009. **114**(5): p. 1099-109.
302. Korngold, R. and J. Sprent, *Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow*. J Exp Med, 1978. **148**(6): p. 1687-98.
303. Bortin, M.M., et al., *Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity*. Nature, 1979. **281**(5731): p. 490-1.
304. Rodt, H., et al., *GVHD suppression by incubation of bone marrow grafts with anti-T-cell globulin: effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation*. Transplant Proc, 1979. **11**(1): p. 962-6.
305. Kolb, H.J., et al., *Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin*. Transplantation, 1979. **27**(4): p. 242-5.
306. Truitt, R.L. and A.A. Atasoylu, *Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow*. Bone Marrow Transplant, 1991. **8**(1): p. 51-8.
307. Apperley, J.F., et al., *Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse*. Bone Marrow Transplant, 1986. **1**(1): p. 53-66.
308. Odom, L.F., et al., *Remission of relapsed leukaemia during a graft-versus-host reaction. A "graft-versus-leukaemia reaction" in man?* Lancet, 1978. **2**(8089): p. 537-40.
309. Weiden, P.L., et al., *Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts*. N Engl J Med, 1979. **300**(19): p. 1068-73.
310. Horowitz, M.M., et al., *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. Blood, 1990. **75**(3): p. 555-62.
311. Collins, R.H., Jr., et al., *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 433-44.

312. Ringden, O., et al., *Effector cells of graft-versus-host disease, host resistance, and the graft-versus-leukemia effect: summary of a workshop on bone marrow transplantation*. Transplant Proc, 1987. **19**(1 Pt 3): p. 2758-61.
313. Yakoub-Agha, I., et al., *Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5695-702.
314. Ringden, O., et al., *The graft-versus-leukemia effect using matched unrelated donors is not superior to HLA-identical siblings for hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2009. **113**(13): p. 3110-8.
315. Wagner, J.E. and E. Gluckman, *Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years*. Semin Hematol. **47**(1): p. 3-12.
316. Goulmy, E., et al., *Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 281-5.
317. Lee, S.J., et al., *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4576-83.
318. Wallny, H.J. and H.G. Rammensee, *Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide*. Nature, 1990. **343**(6255): p. 275-8.
319. van Lochem, E., et al., *Functional expression of minor histocompatibility antigens on human peripheral blood dendritic cells and epidermal Langerhans cells*. Transpl Immunol, 1996. **4**(2): p. 151-7.
320. Goulmy, E., et al., *Alloimmunity to human H-Y*. Lancet, 1976. **2**(7996): p. 1206.
321. Loren, A.W., et al., *Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(7): p. 758-69.
322. Maruya, E., et al., *Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants*. Blood, 1998. **92**(6): p. 2169-76.
323. Tseng, L.H., et al., *Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation*. Blood, 1999. **94**(8): p. 2911-4.
324. Laurin, D., et al., *Immunomonitoring of graft-versus-host minor histocompatibility antigen correlates with graft-versus-host disease and absence of relapse after graft*. Transfusion. **50**(2): p. 418-28.
325. Randolph, S.S., et al., *Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants*. Blood, 2004. **103**(1): p. 347-52.
326. Gahrton, G., *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: impact of donor-recipient sex combination in allogeneic transplantation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(2): p. 219-29.
327. Marijt, W.A., et al., *Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2742-7.
328. Ringden, O., et al., *Is there a graft-versus-leukaemia effect in the absence of graft-versus-host disease in patients undergoing bone marrow transplantation for acute leukaemia?* Br J Haematol, 2000. **111**(4): p. 1130-7.
329. Rezvani, K. and A.J. Barrett, *Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(3): p. 437-53.

330. Michalek, J., et al., *Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1180-4.
331. Kapp, M., et al., *CD8+ T-cell responses to tumor-associated antigens correlate with superior relapse-free survival after allo-SCT*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(5): p. 399-410.
332. Johnston, L., *Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft sources and conditioning intensity*. Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(2): p. 177-92.
333. Beatty, P.G., et al., *Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings*. N Engl J Med, 1985. **313**(13): p. 765-71.
334. Michallet, M., et al., *Predictive factors for outcomes after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies: a 10-year retrospective analysis from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire*. Exp Hematol, 2008. **36**(5): p. 535-44.
335. Weisdorf, D.J., et al., *Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: comparative analysis of unrelated versus matched sibling donor transplantation*. Blood, 2002. **99**(6): p. 1971-7.
336. Cutler, C., et al., *Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3685-91.
337. Eapen, M., et al., *Peripheral blood grafts from unrelated donors are associated with increased acute and chronic graft-versus-host disease without improved survival*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(12): p. 1461-8.
338. Perez-Simon, J.A., et al., *Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation*. Br J Haematol, 2005. **130**(3): p. 394-403.
339. Lacerda, J.F., et al., *Unrelated stem cell transplantation after a reduced intensity conditioning regimen containing high-dose thymoglobulin leads to controllable graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(4): p. 494-7.
340. Couriel, D.R., et al., *Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2004. **10**(3): p. 178-85.
341. Deeg, H.J., et al., *Conditioning-related toxicity and acute graft-versus-host disease in patients given methotrexate/cyclosporine prophylaxis*. Bone Marrow Transplant, 1991. **7**(3): p. 193-8.
342. Markiewicz, M., et al., *Immunogenic disparities of 11 minor histocompatibility antigens (mHAs) in HLA-matched unrelated allogeneic hematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(4): p. 293-300.
343. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
344. Chakraverty, R. and M. Sykes, *The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia*. Blood, 2007. **110**(1): p. 9-17.
345. Zhang, Y., et al., *Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease*. J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1335-44.
346. Hill, G.R., et al., *Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines*. Blood, 1997. **90**(8): p. 3204-13.
347. Cooke, K.R., et al., *LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1581-9.

348. Teshima, T., et al., *Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium*. Nat Med, 2002. **8**(6): p. 575-81.
349. Wysocki, C.A., et al., *Leukocyte migration and graft-versus-host disease*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4191-9.
350. Sasaki, M., et al., *Antagonist of secondary lymphoid-tissue chemokine (CCR ligand 21) prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 588-96.
351. Coghill, J.M., et al., *Separation of graft-versus-host disease from graft-versus-leukemia responses by targeting CC-chemokine receptor 7 on donor T cells*. Blood. **115**(23): p. 4914-22.
352. Xun, C.Q., et al., *Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2360-7.
353. Hamilton, S.E. and S.C. Jameson, *The nature of the lymphopenic environment dictates protective function of homeostatic-memory CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18484-9.
354. Oelert, T., et al., *Irradiation and IL-15 promote loss of CD8 T-cell tolerance in response to lymphopenia*. Blood. **115**(11): p. 2196-202.
355. Maeda, Y., et al., *Lymphopenia-induced proliferation of donor T cells reduces their capacity for causing acute graft-versus-host disease*. Exp Hematol, 2007. **35**(2): p. 274-86.
356. Bharat, A., et al., *Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection*. Transplantation, 2007. **83**(2): p. 150-8.
357. Holler, E., et al., *Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F)*. Blood, 1995. **86**(3): p. 890-9.
358. Shlomchik, W.D., et al., *Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells*. Science, 1999. **285**(5426): p. 412-5.
359. Duffner, U.A., et al., *Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7393-8.
360. Merad, M., et al., *Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 510-7.
361. Kim, T.D., et al., *Organ-derived dendritic cells have differential effects on alloreactive T cells*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2929-40.
362. Turner, B.E., et al., *Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplant determines the kinetics of acute graft-versus-host disease*. Transplantation, 2008. **86**(7): p. 968-76.
363. Haniffa, M., et al., *Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 371-85.
364. Horvath, R., et al., *Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease*. Clin Immunol, 2009. **131**(1): p. 60-9.
365. Durakovic, N., et al., *Host-derived Langerhans cells persist after MHC-matched allografting independent of donor T cells and critically influence the alloresponses mediated by donor lymphocyte infusions*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4414-25.

366. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.
367. Adachi, Y., et al., *Semiquantitative detection of cytokine messages in X-irradiated and regenerating rat thymus*. Radiat Res, 2005. **163**(4): p. 400-7.
368. Gendelman, M., et al., *Host conditioning is a primary determinant in modulating the effect of IL-7 on murine graft-versus-host disease*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3328-36.
369. Ghayur, T., et al., *Complete sequential regeneration of graft-vs.-host-induced severely dysplastic thymuses. Implications for the pathogenesis of chronic graft-vs.-host disease*. Am J Pathol, 1988. **133**(1): p. 39-46.
370. Hauri-Hohl, M.M., et al., *Donor T-cell alloreactivity against host thymic epithelium limits T-cell development after bone marrow transplantation*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4080-8.
371. Proietto, A.I., S. van Dommelen, and L. Wu, *The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(1): p. 39-45.
372. Bonasio, R., et al., *Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1092-100.
373. Li, J., et al., *Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 607-22.
374. Zhang, Y., et al., *CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3305-14.
375. Brouwer, R.E., et al., *The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses*. Hum Immunol, 2000. **61**(6): p. 565-74.
376. Clark, R.E., et al., *Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein*. Blood, 2001. **98**(10): p. 2887-93.
377. Buggins, A.G., et al., *Effect of costimulation and the microenvironment on antigen presentation by leukemic cells*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3479-90.
378. Bacigalupo, A., et al., *Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p. 1628-33.
379. Craddock, C.F., *Full-intensity and reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in AML*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(5): p. 415-23.
380. Fuji, S., et al., *Preengraftment serum C-reactive protein (CRP) value may predict acute graft-versus-host disease and nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(5): p. 510-7.
381. Mohty, M., et al., *Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4407-11.
382. Alyea, E.P., et al., *Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1810-4.
383. Remberger, M., et al., *Risk factors for acute graft-versus-host disease grades II-IV after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation with unrelated donors: a single centre study*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(4): p. 399-405.
384. Sala-Torra, O., et al., *Serious acute or chronic graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation: a comparison of myeloablative and*

- nonmyeloablative conditioning regimens*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(10): p. 887-93.
385. Mohty, M., et al., *Reduced-intensity versus conventional myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation*. Blood.
386. Khouri, I.F., et al., *Eight-year experience with allogeneic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5530-6.
387. Morris, E., et al., *Outcomes after alemtuzumab-containing reduced-intensity allogeneic transplantation regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3865-71.
388. Sykes, M., *Mixed chimerism and transplant tolerance*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 417-24.
389. Liesveld, J.L. and P.G. Rothberg, *Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence?* Bone Marrow Transplant, 2008. **42**(5): p. 297-310.
390. Gibbons, C. and M. Sykes, *Manipulating the immune system for anti-tumor responses and transplant tolerance via mixed hematopoietic chimerism*. Immunol Rev, 2008. **223**: p. 334-60.
391. Aoudjhane, M., et al., *Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2304-12.
392. Tomblyn, M., et al., *Similar and promising outcomes in lymphoma patients treated with myeloablative or nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(5): p. 538-45.
393. Kolb, H.J., *Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4371-83.
394. Chung, B., et al., *Importance of interleukin-7 in the development of experimental graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. **14**(1): p. 16-27.
395. Alpdogan, O., et al., *Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2256-65.
396. Alpdogan, O., et al., *IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1095-107.
397. Li, A., et al., *Co-transplantation of bone marrow stromal cells transduced with IL-7 gene enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation in mice*. Gene Ther, 2006. **13**(15): p. 1178-87.
398. Chung, B., et al., *Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7Ralpha antibody*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2803-10.
399. Snyder, K.M., C.L. Mackall, and T.J. Fry, *IL-7 in allogeneic transplant: clinical promise and potential pitfalls*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(7): p. 1222-8.
400. Sportes, C., et al., *Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy*. Clin Cancer Res. **16**(2): p. 727-35.
401. Dean, R.M., et al., *Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5735-41.
402. Abu-Ghosh, A., et al., *Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/cytokines with the incidence of acute graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1999. **24**(5): p. 535-44.

403. Kumaki, S., et al., *Prolonged secretion of IL-15 in patients with severe forms of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in children.* Int J Hematol, 1998. **67**(3): p. 307-12.
404. Sakata, N., et al., *Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease.* Bone Marrow Transplant, 2001. **27**(11): p. 1153-61.
405. Chik, K.W., et al., *Elevated serum interleukin-15 level in acute graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation.* J Pediatr Hematol Oncol, 2003. **25**(12): p. 960-4.
406. Dulphy, N., et al., *An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation.* J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2227-37.
407. Bhorade, S.M., et al., *Elevation of interleukin-15 protein expression in bronchoalveolar fluid in acute lung allograft rejection.* Chest, 2007. **131**(2): p. 533-8.
408. Conti, F., et al., *Interleukin-15 production during liver allograft rejection in humans.* Transplantation, 2003. **76**(1): p. 210-6.
409. Wang, W.L., et al., *Increased expression of non-interleukin-2 T cell growth factors and their implications during liver allograft rejection in rats.* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(7): p. 1141-7.
410. Pavlakis, M., et al., *Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection.* Transplantation, 1996. **62**(4): p. 543-5.
411. Via, C.S., et al., *IL-12 stimulates the development of acute graft-versus-host disease in mice that normally would develop chronic, autoimmune graft-versus-host disease.* J Immunol, 1994. **153**(9): p. 4040-7.
412. Williamson, E., et al., *IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice.* J Immunol, 1996. **157**(2): p. 689-99.
413. Okubo, T., et al., *Administration of an IL-12-encoding DNA plasmid prevents the development of chronic graft-versus-host disease (GVHD).* J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4013-7.
414. Sykes, M., et al., *Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease.* Blood, 1995. **86**(6): p. 2429-38.
415. Yang, Y.G., et al., *Interleukin-12 preserves the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-versus-host disease in mice.* Blood, 1997. **90**(11): p. 4651-60.
416. Appay, V., et al., *Immuno-monitoring of CD8+ T cells in whole blood versus PBMC samples.* J Immunol Methods, 2006. **309**(1-2): p. 192-9.
417. Higgins, J., et al., *Effects of lymphocyte isolation and timing of processing on detection of CD127 expression on T cells in human immunodeficiency virus-infected patients.* Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(1): p. 228-30.
418. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1215.
419. Shamim, Z., et al., *Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukin-7 receptor-alpha: prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(5): p. 485-91.
420. Nielsen, O.H., et al., *The circulating common gamma chain (CD132) in inflammatory bowel disease.* Am J Gastroenterol, 1998. **93**(3): p. 323-8.
421. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis.* Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
422. Albuquerque, A.S., et al., *Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7Ralpha expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with*

- similar hyperimmune activation but distinct outcomes. J Immunol, 2007. 178(5): p. 3252-9.*
423. Song, H., et al., *A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. Int J Immunogenet, 2007. 34(2): p. 107-13.*
 424. Hamzaoui, K., et al., *Levels of IL-15 in serum and cerebrospinal fluid of patients with Behcet's disease. Scand J Immunol, 2006. 64(6): p. 655-60.*
 425. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett, *Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 657-79.*
 426. Hassan, J. and D.J. Reen, *Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. J Immunol, 2001. 167(4): p. 1970-6.*
 427. Stubbe, M., et al., *Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines. Eur J Immunol, 2008. 38(1): p. 273-82.*
 428. Harari, A., et al., *Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. Immunol Rev, 2006. 211: p. 236-54.*
 429. Paiardini, M., et al., *Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals. J Immunol, 2005. 174(5): p. 2900-9.*
 430. Kim, H.R., et al., *Altered IL-7Ralpha expression with aging and the potential implications of IL-7 therapy on CD8+ T-cell immune responses. Blood, 2006. 107(7): p. 2855-62.*
 431. Romero, P., et al., *Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. J Immunol, 2007. 178(7): p. 4112-9.*
 432. van Leeuwen, E.M., et al., *IL-7 receptor alpha chain expression distinguishes functional subsets of virus-specific human CD8+ T cells. Blood, 2005. 106(6): p. 2091-8.*
 433. Kim, H.R., et al., *Down-regulation of IL-7Ralpha expression in human T cells via DNA methylation. J Immunol, 2007. 178(9): p. 5473-9.*
 434. Kanegane, H. and G. Tosato, *Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. Blood, 1996. 88(1): p. 230-5.*
 435. Perola, O., A. Ripatti, and J. Pelkonen, *T-lymphocyte subpopulations do not express identical combinations of interleukin-2 receptor chains in the early phase of their activation and proliferation. Scand J Immunol, 2000. 52(2): p. 123-30.*
 436. Dunne, J., et al., *Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. J Immunol, 2001. 167(6): p. 3129-38.*
 437. Takayama, E., et al., *Functional and Vbeta repertoire characterization of human CD8+ T-cell subsets with natural killer cell markers, CD56+ CD57- T cells, CD56+ CD57+ T cells and CD56- CD57+ T cells. Immunology, 2003. 108(2): p. 211-9.*
 438. Willinger, T., et al., *Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. J Immunol, 2005. 175(9): p. 5895-903.*
 439. Labalette, M., et al., *Peripheral human CD8(+)CD28(+)T lymphocytes give rise to CD28(-)progeny, but IL-4 prevents loss of CD28 expression. Int Immunol, 1999. 11(8): p. 1327-36.*
 440. Mueller, Y.M., et al., *IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. Int Immunol, 2003. 15(1): p. 49-58.*
 441. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. J Exp Med, 2001. 194(12): p. 1711-9.*
 442. Sasson, S.C., et al., *Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. J Infect Dis, 2006. 193(4): p. 505-14.*

443. Dhédin N., V.J., *Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : réalisation et complications*. Hématologie, ed. P. Elsevier Masson SAS. 2010.
444. O'Brien, S., et al., *Results of fludarabine and prednisone therapy in 264 patients with chronic lymphocytic leukemia with multivariate analysis-derived prognostic model for response to treatment*. *Blood*, 1993. **82**(6): p. 1695-700.
445. Condomines, M., et al., *Increased plasma-immune cytokines throughout the high-dose melphalan-induced lymphodepletion in patients with multiple myeloma: a window for adoptive immunotherapy*. *J Immunol*. **184**(2): p. 1079-84.
446. Teutsch, S.M., et al., *Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-alpha gene and their associations with multiple sclerosis*. *Eur J Hum Genet*, 2003. **11**(7): p. 509-15.
447. Azarpira, N., et al., *Interleukin-7 receptor-alpha gene polymorphisms in bone marrow transplant recipients*. *Mol Biol Rep*. **37**(1): p. 27-31.
448. NCBI, B., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?locusId=3575.
449. Bonifati, C., et al., *Increased interleukin-7 concentrations in lesional skin and in the sera of patients with plaque-type psoriasis*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. **83**(1): p. 41-4.
450. Hartgring, S.A., et al., *Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(9): p. 2595-605.
451. Crawley, A.M., S. Faucher, and J.B. Angel, *Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection*. *J Immunol*. **184**(9): p. 4679-87.
452. Rose, T., et al., *Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients*. *J Immunol*, 2009. **182**(12): p. 7389-97.
453. McKay, F.C., et al., *Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis*. *Genes Immun*, 2008. **9**(1): p. 1-6.
454. Bouchaud, G., et al., *Interleukin-15 and its soluble receptor mediate the response to infliximab in patients with Crohn's disease*. *Gastroenterology*. **138**(7): p. 2378-87.
455. Badoual, C., et al., *The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3907-14.
456. Ofraan, Y., et al., *Diverse patterns of T-cell response against multiple newly identified human Y chromosome-encoded minor histocompatibility epitopes*. *Clin Cancer Res*. **16**(5): p. 1642-51.
457. Spellman, S., et al., *Effects of mismatching for minor histocompatibility antigens on clinical outcomes in HLA-matched, unrelated hematopoietic stem cell transplants*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(7): p. 856-63.
458. Hambach, L., E. Spierings, and E. Goulmy, *Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(2): p. 171-87.
459. van Halteren, A.G., et al., *Naturally acquired tolerance and sensitization to minor histocompatibility antigens in healthy family members*. *Blood*, 2009. **114**(11): p. 2263-72.
460. Aoyama, K., et al., *Improved outcome of allogeneic bone marrow transplantation due to breastfeeding-induced tolerance to maternal antigens*. *Blood*, 2009. **113**(8): p. 1829-33.
461. Nielsen, H.S., et al., *Association of HY-restricting HLA class II alleles with pregnancy outcome in patients with recurrent miscarriage subsequent to a firstborn boy*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(9): p. 1684-91.

462. Foster, A.E., et al., *Human CD62L- memory T cells are less responsive to alloantigen stimulation than CD62L+ naive T cells: potential for adoptive immunotherapy and allodepletion*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2403-9.
463. Martino, R., et al., *Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes*. *Blood*, 2006. **108**(3): p. 836-46.
464. Yakoub-Agha, I., et al., *Immune reconstitution following myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: the impact of expanding CD28negative CD8+ T cells on relapse*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(4): p. 496-504.
465. Klebanoff, C.A., et al., *IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(7): p. 1969-74.
466. Eparaud, M., et al., *Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2972-83.
467. Dubsky, P., et al., *IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(6): p. 1678-90.
468. Tamang, D.L., et al., *Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens: multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal*. *Cytokine*, 2006. **36**(3-4): p. 148-59.
469. Motegi, A., et al., *IL-15-induced CD8+CD122+ T cells increase antibacterial and anti-tumor immune responses: implications for immune function in aged mice*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(4): p. 1047-56.
470. Savani, B.N., et al., *Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2007. **21**(10): p. 2145-52.
471. Chen, G., et al., *Expanded donor natural killer cell and IL-2, IL-15 treatment efficacy in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Eur J Haematol*, 2008. **81**(3): p. 226-35.
472. Alpdogan, O., et al., *Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation*. *Blood*, 2005. **105**(2): p. 865-73.
473. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
474. Weitzmann, M.N., et al., *Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1873-8.
475. Sawa, Y., et al., *Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 447-57.
476. Ariizumi, K., et al., *IFN-gamma-dependent IL-7 gene regulation in keratinocytes*. *J Immunol*, 1995. **154**(11): p. 6031-9.
477. Oshima, S., et al., *Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(14): p. 6298-310.
478. Thang, P.H., et al., *The role of IL-1beta in reduced IL-7 production by stromal and epithelial cells: a model for impaired T-cell numbers in the gut during HIV-1 infection*. *J Intern Med*. **268**(2): p. 181-93.
479. van Roon, J.A., et al., *Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62**(2): p. 113-9.

480. Hartgring, S.A., et al., *Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65 Suppl 3**: p. iii69-74.
481. Bozza, F.A., et al., *Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis*. Crit Care, 2007. **11**(2): p. R49.
482. Bikker, A., et al., *Increased expression of interleukin-7 in labial salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome correlates with increased inflammation*. Arthritis Rheum. **62**(4): p. 969-77.
483. Muro, S., et al., *Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(6): p. 970-5.
484. Rentzos, M., et al., *IL-15 is elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2006. **241**(1-2): p. 25-9.
485. Liu, Z., et al., *IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production*. J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3608-15.
486. van Heel, D.A., *Interleukin 15: its role in intestinal inflammation*. Gut, 2006. **55**(4): p. 444-5.
487. Sakai, T., et al., *Interleukin 15 activity in the rectal mucosa of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1998. **114**(6): p. 1237-43.