



HAL
open science

Impact et conséquences de l'atteinte de la barrière intestinale au cours du traitement des leucémies aiguës myéloïdes

Thomas Hueso

► **To cite this version:**

Thomas Hueso. Impact et conséquences de l'atteinte de la barrière intestinale au cours du traitement des leucémies aiguës myéloïdes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS020 . tel-02466311

HAL Id: tel-02466311

<https://theses.hal.science/tel-02466311>

Submitted on 4 Feb 2020

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.

UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTE DE LILLE

Thèse d'Université

Discipline : Biologie - Santé

Présentée par

Thomas HUESO

**Impact et conséquences de l'atteinte de la barrière intestinale au cours du
traitement des leucémies aiguës myéloïdes**

Thèse dirigée par

le Professeur David SEGUY

le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA (Co-directeur)

Soutenue publiquement le 23 Octobre 2019 devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Noël MILPIED	Président du jury
Madame le Professeur Laure BINDELS	Rapporteur
Monsieur le Professeur Pascal CRENN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Ibrahim YAKOUB-AGHA	Examineur
Monsieur le Professeur David SEGUY	Examineur

Ce travail a été réalisé au sein du Centre de recherche LIRIC UMR 995, dirigé par le Professeur Desreumaux, au sein de l'équipe « Modulation nutritionnelle de l'inflammation et de l'infection » dirigée par le Professeur Frédéric Gottrand et le Docteur Jean-Luc Desseyn

LIRIC- UMR 995 Inserm/ Université Lille/ CHRU de Lille

Faculté de Médecine – Pôle recherche

1 place de Verdun

59045 Lille Cedex France

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'institut MICALIS, au sein de l'équipe « Microbiote et santé digestive pulmonaire » dirigée par le Docteur Muriel Thomas

Commensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory. Institut MICALIS INRA

Domaine de Vilvert

78352 Jouy en Josas France

Remerciements

Je remercie,

Monsieur le Professeur David Seguy. Vous m'avez accompagné depuis mes débuts dans la recherche, de la culture des macrophages en 2014 au séquençage des iléons en 2019. Vous m'avez accordé toute votre confiance et apporté un soutien sans faille. Merci pour vos conseils, votre disponibilité (à toute heure), et votre détermination hors du commun. Vous m'avez fait l'honneur d'être mon directeur de thèse

Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub-Agha. Vous m'avez donné l'envie de m'engager dans cette aventure lors de votre intervention sur l'allogreffe au Touquet en 2013. Vous m'avez fait confiance et soutenu tout au long de la réalisation de mon projet. Merci pour votre enthousiasme et vos conseils toujours avisés. Vous m'avez fait l'honneur de co-diriger ma thèse

Monsieur le Professeur Noël Milpied. Votre expertise et vos conseils au début de mes recherches en 2015 ont contribué à la première publication de cette thèse. Vous me faites l'honneur de juger ce travail

Monsieur le Professeur Pascal Crenn. Vos travaux novateurs sur la citrulline nous permettent aujourd'hui d'explorer l'intestin des patients atteints d'hémopathie maligne. Vous me faites l'honneur de juger ce travail

Madame le Professeur Laure Bindels. Vos travaux sur le microbiote et l'intestin permettent de faire avancer la cancérologie moderne. Merci d'avoir accepté mon invitation. Vous me faites l'honneur de juger ce travail

Monsieur le Professeur Frédéric Gottrand. Pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de votre unité. Je n'oublierai pas ces échanges toujours enrichissants du « lundi matin »

Les membres de l'équipe « FG » de l'U995, en particulier Messieurs les Docteurs Thierry Jouault et Jean-Luc Desseyn ainsi que le Docteur Valérie Gouyer, Ségolène Plet et Mylène Magnien. Merci pour votre accueil, votre aide à la paillasse ainsi que votre esprit critique tout au long de ce travail

L'ensemble des équipes du LIRIC et notamment François Maggiotto, Madjid Djouina, Silvia Speca pour leur aide précieuse à la paillasse

Les Docteurs Cécile Vignal, Laurent Dubuquoy, Bertrand Meresse et Lennart Mars pour leurs conseils bienveillants et leur soutien

A mes co-thésard(e)s, Delphine Ley, Céline Portal et Bastien Demouveaux

Le personnel de l'animalerie Lille 2, d'avoir veillé sur mes souris

Le service commun de Morphologie cellulaire de l'Université de Lille 2, et particulièrement Marie-Hélène Gevaert, pour la réalisation des coupes histologiques. La plateforme d'imagerie cellulaire et tout particulièrement, Antonino Bongiovanni pour les « prises » au microscope

L'équipe de l'institut MICALIS et notamment les docteurs Camille Mayeur et Muriel Thomas qui m'ont fait découvrir les joies de la qPCR et du microbiote. Merci pour votre accueil à « Jouy », vos conseils avisés ainsi que votre accompagnement au cours de ce projet passionnant

Au Docteur Paul-Louis Woerther, notre rencontre fortuite a permis notre collaboration et ce beau travail

A mes amis et rencontres du Nord, par ordre d'apparition : Bernard, Marie-Aubrey, Claire, Eugénie, Jeremy, Simon, Emilie, Jordan, Emily, Pauline, Fabrice, Charlotte, Fabien, les Touquettois, les Berckois

A mes amis du Sud-Ouest, le Bettex : Julio et Clémence, Samy et Julie, Benji et Sarah, YoPo et Marie, Guillaume et Cathy, Gryngo et Sarah, Pepe et Romain, Pey et Marine, Jerem et Cathy, Chachou et Pépito, Justine et Jona, Arnaud et Sophie

A mes fidèles acolytes caennais : Geoffrey, Claire, Antoine, Marie, Ponpon, Alex, Re Bernard, Fabrice et Pauline

A mes beaux-parents

Ceux sans qui je ne serais pas et n'en serai pas là : Mes parents, mes grands-
parents

A ma sœur Mathilde

A Victoria

Communications scientifiques

Communications à des congrès scientifiques internationaux :

(CO : communication orale, CA : communication affichée)

Hueso T, Joncquel M, Magro L, *et al.* Influence of Gut Health and Macrophages Reactivity before Conditioning Regimen in Acute Graft Versus Host Disease. *Clin Nutr.* 2016;35:S16-S17. S0261-5614(16)30279-5. **CO**, *ESPEN*, Copenhague 2016

Hueso T, Magro L, Coiteux V, *et al.* Gut impairment and host macrophages reactivity before conditioning regimen predict the development of acute graft versus host disease. *BMT.* 2015;51:S386. **CA**, *EBMT*, Valence 2016

Hueso T, Joncquel M, Gauthier J, *et al.* Citrulline, an Early Predictive Marker of High-Grade Acute Graft-Versus-Host Disease. *Clin Nutr.* 2017 ;36:S23. **CO**, *ESPEN*, La Haye 2017

Hueso T, Amini, Mayeur C, *et al.* Strengthen intestinal barrier during induction chemotherapy. *Clin Nutr.* 2018 37:S204. **CA**, *ESPEN*, Madrid 2018

Communications à des congrès scientifiques francophones :

(CO : communication orale, CA : communication affichée)

Hueso T, Coiteux V, Magro L, Briand G, Jouault T, Yakoub-Agha I, Seguy D. Influence de l'atteinte intestinale sur la réaction aiguë du greffon contre l'hôte Journées francophones de nutrition. **CO**, *JFN*, Marseille 2015

Hueso T, Coiteux V, Magro L, Briand G, Jouault T, Yakoub-Agha I, Seguy D. Influence de l'atteinte intestinale sur la réaction aiguë du greffon contre l'hôte Société française de greffe de moelle & thérapies cellulaires. **CA**, *SFGM-TC*, Clermont-Ferrand 2015

Hueso T, Varlet P, Gauthier J, Labalette M, Yakoub-Agha I, Seguy D. Rôle de la réactivité des macrophages dans la réaction aiguë du greffon contre l'hôte. **CA** *SFGM-TC*, Liège 2016

Liste des figures et tableaux

Figure 1. Représentation synthétique du parcours de soin des LAM bénéficiant d'un traitement intensif	16
Figure 2. Procédure de greffe de cellules souches hématopoïétiques	20
Figure 3. Type de conditionnement en fonction de l'intensité	23
Figure 4. Complications infectieuses induites par la procédure d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	25
Figure 5. Illustrations de GvH aiguë cutanée et digestive	29
Figure 6. Physiopathologie de la GvH aiguë	31
Figure 7. Courbe de survie en fonction du grade de la GvH aiguë au CHU de Lille entre Janvier 2013 et Juillet 2015	34
Figure 8. Composition et concentration des espèces bactériennes dominantes dans les différentes régions du tractus digestif	42
Figure 9. Le cycle de la citrulline	46
Figure 10. Mécanismes physiopathologiques d'atteinte de la barrière intestinale lors de la GvH aiguë	50
Figure 11. Les différentes mucines présentes chez l'homme	55
Figure 12. Synthèse et construction de la protéine recombinante comportant 12 domaines CYS	56
Figure 13. Modifications des interactions entre les différentes protéines MUC2 induites par le transgène composé de 12 domaines cystéines (en bleu)	57
Figure 14. Visualisation du transgène au sein de la lumière intestinale du côlon des souris transgéniques Tg222 en immunohistochimie	58
Figure 15. Représentation schématique de l'atteinte de la barrière intestinale au cours du traitement des LAM	107

Tableau 1. Classification des LAM selon l'ELN 2017	14
Tableau 2. Stades de la GvH aiguë	27
Tableau 3. Grades de la GvH aiguë	27
Tableau 4. Manifestations cliniques de la GvH chronique	36

Abréviations

Allo-CSH : Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGCC : Acide gras à chaîne courte

AMM : Autorisation de mise sur le marché

APC : Antigen presenting cells

CsA : Ciclosporine

Cr- EDTA : Chrome- EDTA

CD : Cluster de différenciation

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule présentatrice d'antigènes

CSP : Cellules souches périphériques

CYS : Cysteine

DRI : Disease risk index

DSS : Dextran sulfate sodium

EBV : Epstein-Barr virus

ELN : European leukemia Net

FAB : Franco-Américano-Britannique

FDA : Federal drug administration

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

GvH : Graft-versus-Host disease

GvL : Graft-versus-Leukemia

GLP : Glucagon-like-peptide

HCT-CI : Hematopoietic cell transplant-specific comorbidity index

HHV6 : Herpes human virus 6

HLA : Human leukocytes antigen

HSP : Heat shock protein

IL : Interleukin

ILC : Innate lymphoid cells

INF- γ : Interféron gamma

ISC : Intestinal stem cells

KGF : Keratinocyte growth factor
KO : Knock-out
Lc : Lymphocytes
LGR : leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor
LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM : Leucémie aiguë myéloblastique
LPS : Lipopolysaccharide
MAC : Myeloablative conditioning
MMF : Mycophénolate Mofétil
MO : Moelle osseuse
MTX : Méthotrexate
MVO : Maladie veino-occlusive
NIH : National institutes of health
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NE : Nutrition entérale
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORL : Oto-rhino-laryngologique
PAMP : Pathogens associated molecular patterns
PCR ; Polymerase chain reaction
REG3 α : Regenerating islet-derived protein 3-alpha
ROC : Receiver operating characteristic
ST2 : Suppression of tumorigenicity-2
S/T/P : Serine/Thréonine/Proline
Tff3 : Trefoil factor factor 3
Tg : Transgénique
Th : T helper
Treg : T régulateur
TLR : Toll-like receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
mTOR : mammalian Target of rapamycin

Sommaire

Sommaire.....	11
Introduction	13
I. Les leucémies aiguës myéloïdes	13
I. A. Généralités	13
I. B. Définition	13
I. C. Épidémiologie	15
I. D. Étiologie	15
II. Traitement des leucémies aiguës myéloïdes	15
II. A. Induction.....	16
II. B. Consolidation	18
II. C. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	18
II. C. 1. Définition.....	18
II. C. 2. Le choix du donneur.....	20
II. C. 3. Le choix du greffon.....	21
II. C. 4. Le conditionnement.....	22
II. D. Complications.....	23
II. D. 1. Complications infectieuses.....	24
II. D. 2. Complications tardives	25
II. D. 3. La réaction du greffon contre l'hôte.....	26
III. La réaction aiguë du greffon contre l'hôte	27
III. A. Diagnostic.....	27
III. B. Physiopathologie.....	30
III. B. 1. Etape 1 : Activation des cellules de l'hôte.	31
III. B. 2. Etape 2 : Activation des CPA et des cellules du donneur.	31
III. B. 3. Etape 3 : Destruction des tissus cibles.....	32
III. C. Traitement de la réaction aiguë du greffon contre l'hôte.....	33
III. C. 1. Prophylactique.....	33
III. C. 2. Curatif.....	33
IV. La réaction chronique du greffon contre l'hôte	35
V. La Barrière intestinale	38
V. A. Définition	38
V. B. Composition	38
V. B. 1. L'épithélium intestinal.....	38
V. B. 2. Le mucus intestinal	40
V. B. 3. Le microbiote intestinal	41
VI. Toxicité de la chimiothérapie sur la barrière intestinale.....	42
VI. A. La mucite	42
VI. B. Evaluation de la perméabilité intestinale	44
VII. Atteinte de la barrière intestinale dans la GvH aiguë.....	46
VII. A. Atteinte de l'épithélium.....	46
VII. B. La dysbiose.....	48
VIII. Renforcement de la barrière intestinale.....	50
VIII. A. Préservation de l'épithélium intestinal	50
VIII. A. 1. Les approches hormonales.....	50
VIII. A. 2. Les approches cellulaires.....	51
VIII. A. 3. Les approches nutritionnelles	52
VIII. B. Renforcement du microbiote intestinal	52

VIII. B. 1. <i>Les probiotiques</i>	52
VIII. B. 2. <i>La transplantation fécale</i>	53
VIII. C. Renforcement du mucus intestinal	54
VIII. C. 1. <i>La mucine MUC 2 et le domaine CYS</i>	54
VIII. C. 2. <i>La souris Tg222</i>	56
Objectifs de la thèse	59
Articles originaux	60
I. Article 1 : Consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier and microbiota in acute myeloid leukemia: a translational study	60
I. A. Présentation et résultats de l'étude	60
II. A. Article	61
II. Article 2 : Citrulline and monocyte-derived macrophages before conditioning predict acute Graft-versus-Host disease.....	101
II. A. Présentation et résultats de l'étude	101
II. B. Article	101
III. Article 3 : Association between low plasma level of citrulline before allogeneic stem cell transplantation and severe gastrointestinal Graft vs. Host disease	102
III. A. Présentation et résultats de l'étude	102
III. B. Article	102
Discussion.....	103
Références	108
Résumés.....	122

Introduction

I. Les leucémies aiguës myéloïdes

I. A. Généralités

Les leucémies aiguës (LA) se caractérisent par une infiltration de la moelle osseuse (MO) par des cellules blastiques. Ces « blastes » sont issues de cellules pro-génitrices hématopoïétiques anormales ayant acquis la capacité de se diviser, de se renouveler, et de proliférer de façon anarchique. Elles correspondent à l'émergence d'un clone leucémique pouvant être engagé soit dans la voie lymphoïde, dans le cas des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), soit dans la voie myéloïde, dans le cas des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). En envahissant la MO, une leucémie aiguë va provoquer un défaut de production des éléments figurés du sang (plaquettes, hématies, leucocytes) conduisant à un syndrome d'insuffisance médullaire. La LA se manifeste cliniquement par un tableau polymorphe pouvant associer un syndrome infectieux, anémique ou hémorragique à l'origine d'une morbi-mortalité importante.

I. B. Définition

Selon la classification des tumeurs hématopoïétiques publiées en 2008 par l'organisation mondiale de la santé et actualisée en 2016, le diagnostic de LAM est posé en cas d'infiltration de la MO par plus de 20 % de blastes d'origine myéloïde¹. Leur diagnostic repose par conséquent sur l'analyse des cellules de la MO basée sur des critères morphologiques (taille, présence de granulations, de corps d'Auer), biochimiques (coloration à la myéloperoxydase) et immunophénotypiques (cluster de différenciation ou CD) des blastes². Historiquement la classification FAB (Franco-Américano-Britannique) des LAM repose sur le degré de différenciation des blastes. Elle permet de classer ces leucémies de 0 à 7 : les LAM 0 à 2 dépendent du degré de maturation des myéloblastes; la

LAM 3 ou LA promyélocytaire est caractérisée par une prolifération de promyélocytes dont le tableau clinique et le traitement restent très spécifiques; les LAM 4 et 5 sont définies par une composante monoblastique et monocytaire de plus de 20%; la LAM 6 est l'érythroleucémie définie par la présence de plus de 50 % de blastes de la lignée érythroïde dans la MO; la LAM 7 ou LA mégacaryoblastique est affirmée par la présence de plus de 20% de blastes de la lignée plaquettaire³.

Cette classification, bien qu'ancienne, reste utilisée mais ne permet plus de guider l'attitude thérapeutique. Elle est dorénavant supplantée par la classification de l'European leukemia net qui prend en compte de nouvelles caractéristiques telles que la présence d'anomalie cytogénétique (translocation génétique) et de certains transcrits de fusion détectés par des techniques de biologie moléculaire (polymerase chain reaction). Cette nouvelle classification éditée en 2010 puis révisée en 2017 permet de stratifier le risque pronostic et d'adapter la stratégie thérapeutique (Tableau 1)^{4,5}.

Risk category	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Mutated NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD ^{low} Biallelic mutated CEBPA
Intermediate	Mutated NPM1 and FLT3-ITD ^{high} Wild-type NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD ^{low} (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) 2 5 or del(5q); 2 7; 2 17/abn(17p) Complex karyotype, § monosomal karyotype Wild-type NPM1 and FLT3-ITD ^{high} Mutated RUNX1 Mutated ASXL1 Mutated TP53

Tableau 1. Classification des LAM selon l'European leukemia net (ELN) 2017. Adaptée de Dohner *et al.*⁵

I. C. Épidémiologie

D'après le registre américain, la LAM reste une maladie rare avec une incidence ajustée à l'âge de 4,3 cas/100000 habitants/an sur la période de 2011 à 2015. L'incidence est plus élevée chez l'homme (ratio de 1,4/1), ce qui correspond à 1,2% des nouveaux cas de cancer. Le risque de développer une LAM augmente avec l'âge, avec une médiane d'âge au diagnostic de 67 ans. Par conséquent, près d'un quart des patients atteints d'une LAM ont entre 65 et 74 ans. Son pronostic n'en est pas moins sévère avec une survie globale à 5 ans de 62,7 % sur la période de 2009 à 2015 (D'après les données du National institutes of health (NIH), <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>).

I. D. Étiologie

Des facteurs environnementaux ont été clairement identifiés comme pouvant induire une LAM. Les mieux documentés sont l'exposition aux rayonnements ionisants ou aux cycles benzènes^{6,7}. Certaines chimiothérapies telles que les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase II (anthracyclines) ou encore les poisons du fuseau peuvent aboutir au développement de LAM qui font l'objet d'une entité à part dans la classification de l'OMS⁸. Des anomalies génétiques sont également associées à la survenue de LAM telles la trisomie 21 (syndrome de Down), la maladie de Fanconi ou le syndrome de Li-Fraumeni⁹. Enfin, certaines maladies hématologiques telles que les syndromes myélodysplasiques, myéloprolifératifs ou les aplasies médullaires peuvent évoluer vers une LAM secondaire. Ces dernières ainsi que le syndrome de Down constituent également des entités à part au sein des LAM.

II. Traitement des leucémies aiguës myéloïdes

Le diagnostic de LAM justifie une hospitalisation au sein d'un service spécialisé afin d'initier le traitement en urgence. En effet, en l'absence de traitement, l'évolution d'une

LAM est souvent fatale des suites du syndrome d'insuffisance médullaire. La prise en charge est variable selon les caractéristiques de la LAM, les comorbidités et l'âge du patient. Néanmoins, le traitement optimal repose sur de fortes doses de chimiothérapie dite d'induction, suivie d'une ou plusieurs cures de chimiothérapie dite de consolidation, puis d'une intensification par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) afin de remplacer la MO défectueuse par une MO saine et compatible avec le patient (Figure 1).

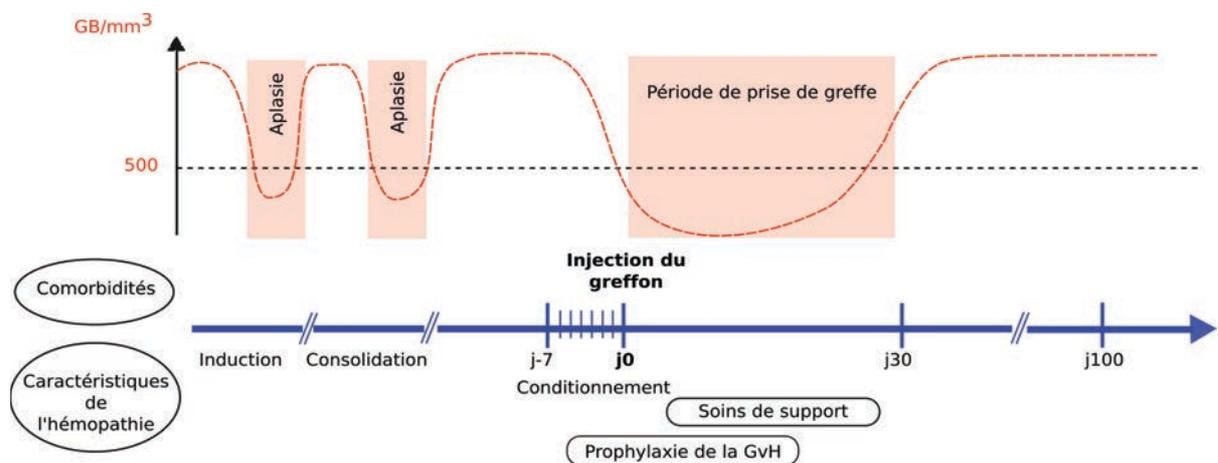


Figure 1. Représentation synthétique du parcours de soin des LAM bénéficiant d'un traitement intensif.

II. A. Induction

Au milieu du siècle dernier, le pronostic des LAM était dramatique avec une médiane de survie n'excédant pas 6 mois. Les travaux de Farber *et al.*, dans les années 1940 ont permis d'obtenir les premières rémissions avec l'aminoptérine ouvrant de nouvelles perspectives dans la recherche d'agents anti-tumoraux¹⁰. Parmi les chimiothérapies proposées à l'époque, c'est la cytosine-arabine (cytarabine) et la daunorubicine qui permettent d'obtenir les taux de rémission les plus élevés, soit autour de 50%^{11,12}. L'association de ces deux drogues au début des années 1970 selon un schéma d'administration comprenant des cycles de 5 jours (cytarabine 2 mg/kg/j de J1 à J5 et

daunorubicine 1,5 mg/kg/j à J1) a permis d'obtenir des taux de rémission de 60 % et constitue encore actuellement le traitement de référence^{13,14}. A ce jour, le modèle d'induction repose dans l'immense majorité des cas sur l'administration d'une anthracycline pendant 3 jours (idarubicine, daunorubicine) et de cytarabine pendant 7 jours (schéma « 3+7 ») *via* une voie veineuse centrale.

La cytarabine est un analogue des bases pyrimidiques et s'intercale dans l'ADN en bloquant sa réplication. Les anthracyclines agissent par différentes voies comme agent intercalant, induisent des cassures au niveau de l'ADN, ou encore bloquent le cycle cellulaire. Ce sont également de puissants analogues de la topoisomérase II capables de bloquer la mitose¹⁵. Il en résulte une destruction de l'ensemble des cellules à renouvellement rapide et notamment des cellules blastiques, mais également de toutes les lignées sanguines conduisant à une agranulocytose définie par des polynucléaires neutrophiles < 500 éléments/mm³ de sang circulant. Cet état d'aplasie expose le malade aux complications hémorragiques et infectieuses durant les 3 à 4 semaines qui suivent. Dans près de 70% des cas, s'en suit la restauration des différentes lignées sanguines permettant d'obtenir la rémission complète, c'est-à-dire une numération formule sanguine proche de la normale (plaquettes >100 G/L, polynucléaires neutrophiles >1 G/L) et une MO normale (équilibrée avec moins de 5% de blastes) 4 à 5 semaines après la fin du traitement¹⁶.

Depuis quelques années, d'autres molécules issues des progrès de l'immunothérapie viennent renforcer l'arsenal thérapeutique et l'action de la chimiothérapie d'induction. Le Gemtuzumab ozogamycin, un anticorps humanisé couplé à la calichéamycine permet de cibler les blastes CD33+. Cette thérapie ciblée a bénéficié en association avec une chimiothérapie d'induction, d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les LAM en première ligne¹⁷. Les inhibiteurs de tyrosine kinase tels que le sorafenib ou la midostaurine font également partie des molécules efficaces dans certaines formes de LAM (mutation du gène codant le récepteur tyrosine kinase FLT3)^{18,19}. Des formes liposomales moins toxiques associant la daunorubicine et la cytarabine ont été

également approuvées par la Federal Drug Administration (FDA) chez les patients âgés de plus de 60 ans présentant une LAM secondaire²⁰.

II. B. Consolidation

La persistance, ou la réapparition d'anomalies génétiques et de cellules leucémiques suite à l'administration d'un schéma « 3+7 », font craindre l'apparition de rechute précoce chez les patients^{21,22}. La brève durée de la rémission obtenue, (6 à 12 mois) et la difficulté d'obtention d'une nouvelle rémission après réinduction chez ces patients, ont motivé la réalisation de cures de chimiothérapie de consolidation et de maintenance basées sur les mêmes drogues^{23,24}. Considérées initialement comme équivalentes, plusieurs études ont depuis montré une efficacité supérieure d'une consolidation avec des doses de chimiothérapies similaires à celles de l'induction, par rapport à une maintenance utilisant des doses plus faibles²⁵. Au prix d'une toxicité plus importante chez les patients âgés, l'administration de fortes doses d'aracytine 3 g/m² associée à un cycle court d'anthracycline 30 mg/m² permet d'obtenir des rémissions prolongées^{26,27}. Actuellement les doses de cytarabine utilisées varient entre 2 et 3 g/m² avec un bon rapport bénéfice/risque²⁸. Des doses intermédiaires (1 à 1,5 g/m²) sont administrées aux patients atteints de leucémies de pronostic favorable selon l'ELN, permettant d'obtenir une guérison dans près de 70 % des cas. En cas de risque intermédiaire et de pronostics non favorables, l'allo-CSH reste le traitement de choix pour les patients de moins de 65 ans⁵.

II. C. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

II. C. 1. Définition

L'allo-CSH est une procédure complexe qui voit le jour au milieu du siècle dernier, suite aux explosions nucléaires mettant fin à de la seconde guerre mondiale. C'est en 1956

qu'Edward Donnall Thomas réalise la première allo-CSH chez un chien puis, chez 2 enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique et pose les bases de cette pratique^{29,30}. C'est à cette époque que les premières complications sont décrites, et notamment l'apparition suite à l'injection du greffon, de la réaction du greffon contre l'hôte ou GvH (graft versus host disease), décrite initialement comme une maladie liée aux «cellules immunologiquement compétentes qui réagissent contre les antigènes des cellules normales de l'hôte »³¹. A ce jour, les principales indications de l'allo-CSH sont les hémopathies myéloïdes et principalement les LAM³². Les bases de cette procédure reposent sur l'immunothérapie. Une fois injectées au patient (receveur), les cellules du donneur vont proliférer et remplacer la MO pathologique tout en exerçant une activité anti-tumorale, c'est l'effet du greffon contre la leucémie ou GvL (graft vs. leukemia).

Une allo-CSH se déroule en 4 étapes. Cela débute par une chimiothérapie intensive, dite de conditionnement de greffe, durant la semaine qui précède la perfusion du greffon qui correspond par convention au J0 de la greffe³⁰. De façon concomitante, un traitement immunosuppresseur est débuté afin de prévenir le rejet du greffon et d'éviter la survenue d'une GvH. Après une période d'aplasie profonde, survient la phase de reconstitution hématologique dans les 15 à 21 jours qui suivent, au cours de laquelle le patient va bénéficier de soins de support afin de prévenir les complications induites par le conditionnement. On quantifie la prise de greffe en évaluant le chimérisme hématopoïétique avec comme objectif d'obtenir un chimérisme « complet donneur » (100%), c'est-à-dire qu'il n'y ait plus aucune cellules du patient détectables (Figure 2).

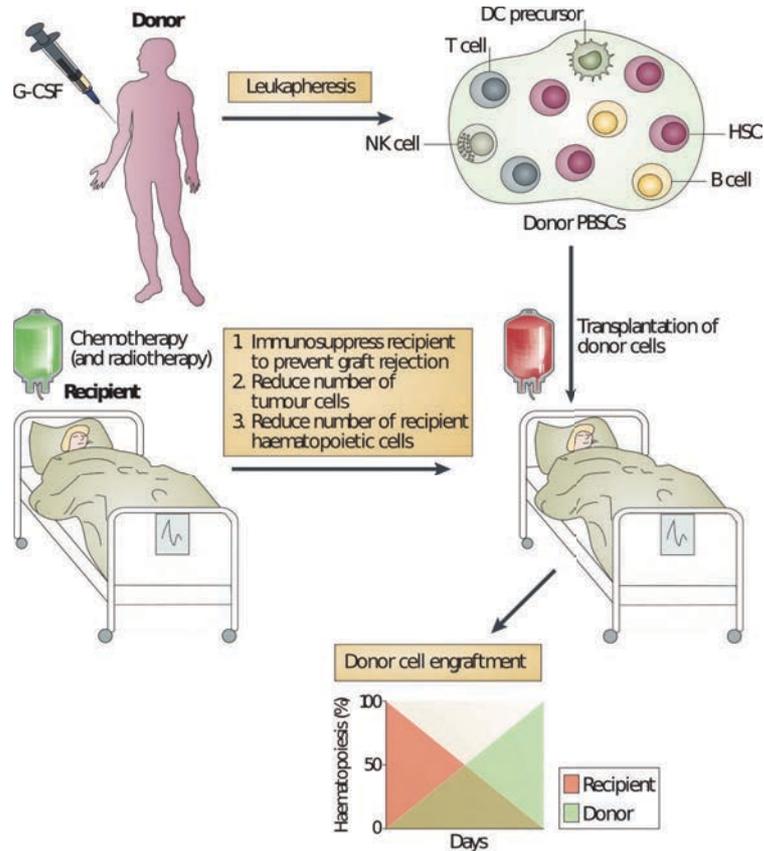


Figure 2. Procédure de greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. D'après Shlomchik *et al.*³³

II. C. 2. Le choix du donneur

Dès que l'indication d'allogreffe est posée, le choix du donneur doit être envisagé. Il repose avant tout sur la compatibilité du système HLA (Human Leukocyte Antigen) entre le patient et le donneur. Le système HLA est constitué d'un ensemble de gènes regroupés sur une région du bras court du chromosome 6 dont certains assurent la fonction de présentation d'antigène et d'histocompatibilité. Cette région est divisée en 3 parties, appelées HLA classe I (contenant les HLA A-B-C), HLA classe II (contenant les HLA DR-DP-DQ) et HLA classe III contenant les gènes codant pour les protéines du complément³⁴. Ces gènes sont polymorphes, exprimés de façon co-dominante et transmis à la descendance par haplotype complet. Le système HLA de classe I dit « classique » regroupant une vingtaine de gènes exprimés sur l'ensemble des cellules nucléées de

l'organisme et les plaquettes. Leur fonction principale est de présenter à la surface des cellules, des protéines du soi (sénescences ou présentant des anomalies de conformation) aux lymphocytes (Lc) T CD8. Le système HLA de classe II est uniquement exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles à savoir les macrophages, les cellules dendritiques et les Lc B. L'activation de ces cellules s'accompagne d'une augmentation de l'expression de ces molécules à leur surface. A l'inverse, les molécules du système HLA de classe II sont dédiées à la présentation d'antigènes du non soi (issues de pathogènes ou exogènes) aux Lc T CD4. Le système HLA joue un rôle crucial dans la réussite d'une allo-CSH. Les Lc T du receveur peuvent reconnaître les cellules du donneur comme étrangère et rejeter le greffon. Inversement les Lc T du donneur peuvent reconnaître les tissus du patient comme étrangers et conduire à une GvH. Ces deux situations peuvent être à l'origine de complications sévères aboutissant à l'échec de la greffe.

II. C. 3. Le choix du greffon

Plusieurs types de donneurs et de cellules souches sont disponibles. Le choix se porte en premier lieu sur un donneur familial géno-identique avec une compatibilité HLA de 10/10 (A-B-C-DR-DP). Etant donné que chaque enfant hérite d'un haplotype maternel et d'un haplotype paternel, la probabilité d'avoir un frère ou une sœur compatible est donc de 25%. Concrètement, il s'avère que dans près de 70 % des cas, le patient ne dispose pas de donneur géno-identique 10/10. Il faut alors interroger un fichier national et international pour trouver un donneur compatible. Dans cette situation, on privilégie le choix d'un donneur 10/10, appelé phéno-identique. Le devenir des patients bénéficiant d'une allogreffe à partir d'un donneur géno-identique ou phéno-identique 10/10 est similaire^{35,36}. Les donneurs phéno-identiques 9/10, les greffes haplo-identiques (1 haplotype en commun, permettant aux parents d'être donneur pour leur enfant) et les unités de sang placentaire sont qualifiés d'alternatifs³⁷. Ces dix dernières années, on constate une augmentation des allogreffes haplo-identiques qui constituent une alternative intéressante

au donneur phéno-identique 10/10^{38,39}. Les unités de sang placentaire sont considérées comme équivalentes à la greffe haplo-identique en terme de survie et taux de rechute, avec cependant un taux de GvH chronique moins important, sachant que peu de données prospectives sont disponibles⁴⁰.

En dehors des unités de sang placentaire qui constituent un type en soi, se pose la question du type de greffon, entre les cellules de la MO ponctionnée dans l'os iliaque du donneur et les cellules souches périphériques (CSP) recueillies dans le sang. Les données récentes prospectives randomisées ne montrent pas de différences en terme de survie, avec cependant moins de GvH chronique chez les patients bénéficiant d'un greffon de MO mais une prise de greffe plus précoce avec les CSP⁴¹. En pratique, les CSP sont plus fréquemment utilisées, excepté en cas de greffe haplo-identiques pour lesquelles la MO sera privilégiée.

II.C. 4. Le conditionnement

Schématiquement, le conditionnement a deux objectifs majeurs: détruire la MO du patient et éviter le rejet de greffe. Ces deux propriétés sont modulées en fonction de l'intensité du conditionnement qui peut être myéloablatif, d'intensité réduite ou non myéloablatif (Figure 3)⁴². Le conditionnement myéloablatif ou MAC (myeloablative conditioning) permet de détruire complètement la MO du patient et de limiter le rejet de greffe. Il se définit comme l'administration d'agents alkylants ou une irradiation corporelle totale à des doses ne permettant pas la reconstitution hématologique autologue. Il est grevé d'une lourde toxicité : aplasie prolongée, atteinte du tube digestif (mucite, colite, maladie veino-occlusive). Il est pour cela réservé aux patients de moins de 60 ans sans comorbidités. Pour les autres patients qui, du fait de leurs comorbidités décrites par Sorrow *et al.* ne peuvent supporter un MAC, des conditionnements d'intensité réduite, voire à l'extrême non myéloablatifs ont été développés⁴³. La toxicité médullaire en est moindre, mais ce type de conditionnement impose un traitement immunosuppresseur plus intense

afin de permettre aux cellules du receveur et du donneur de cohabiter avant que les cellules de ce dernier ne prennent progressivement la place de celles du patient. Ce type de conditionnement est réservé aux patients fragiles et plus âgés, sachant que leur moindre toxicité expose à un risque de rechute plus élevé.

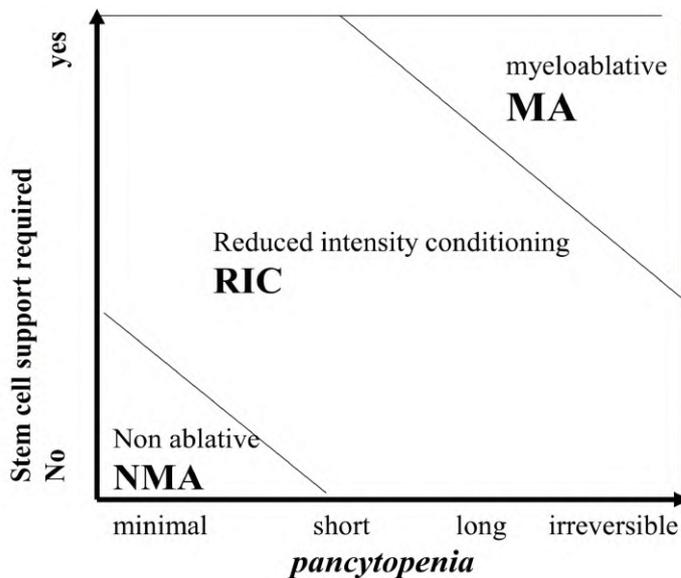


Figure 3. Type de conditionnement en fonction de l'intensité. Adapté de Bacigalupo *et al.*⁴²

II. D. Complications

Elles restent le principal obstacle à la réalisation de l'allogreffe et sont responsables d'une morbi-mortalité élevée. C'est à la phase précoce (entre J0 et J100) qu'elles sont les plus importantes. Certaines sont directement la conséquence du conditionnement, telles que la mucite, la maladie veino-occlusive (MVO), la cystite hémorragique, ou encore le syndrome d'hyperperméabilité capillaire⁴⁴. D'autres sont indirectes, du fait de l'immunosuppression engendrée qui favorise la survenue d'infections bactériennes, fongiques ou virales. Le greffon est à l'origine de complications d'ordre immunologique avec le syndrome de prise de greffe en sortie d'aplasie et la GvH aiguë. Des complications tardives en rapport avec un état d'immunosuppression prolongé peuvent également

survenir. Elles sont dominées par la réactivation de certains virus, la GvH chronique ou encore les cancers secondaires.

II. D. 1. Complications infectieuses

La procédure d'allo-CSH s'accompagne d'une période d'immunodépression prolongée se divisant en trois grandes phases (Figure 4)⁴⁵.

La neutropénie entre J0 à J30 expose le patient aux infections liées aux bactéries provenant du tube digestif ou de la sphère ORL lorsqu'elles franchissent les muqueuses endommagées par la chimiothérapie. Les patients sont également exposés aux infections liées aux cathéters veineux centraux (staphylocoques, levures)^{46,47}. La lymphopénie induite par le conditionnement favorise également l'émergence des infections virales telle que la réactivation du virus BK responsable de cystite hémorragique⁴⁸. A partir du septième jour de neutropénie, apparaissent les infections fongiques. Il s'agit de levures telles que *Candida* spp qui colonisent les tissus et passent dans la circulation générale, ou de filamenteux qui en suspension dans l'air, colonisent les voies respiratoires des patients. Le chef de file en est l'*Aspergillus* spp, avec secondairement les *fusarium* et les *zygomycetes*⁴⁹.

En dépit de la sortie d'aplasie, persistent au-delà de J30 une lymphopénie B et T propices à la réactivation de différents virus: le *Cytomégalo*virus (CMV) à l'origine de colite, d'hépatite ou de rétinite, l'*Epstein-Barr virus* (EBV) pouvant entraîner une lymphoprolifération B post-transplantation, et le virus HHV6 responsable de tableaux neurologiques. A cette période, un parasite, le *Pneumocystis jirovecii*, peut être responsable de pneumopathie sévère.

Au-delà de J100, la lymphopénie prédomine sur le répertoire T et favorise particulièrement les infections à germes encapsulés (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae*). Des infections inhérentes à la présence d'une GvH chronique cutanée ou oculaire peuvent survenir.

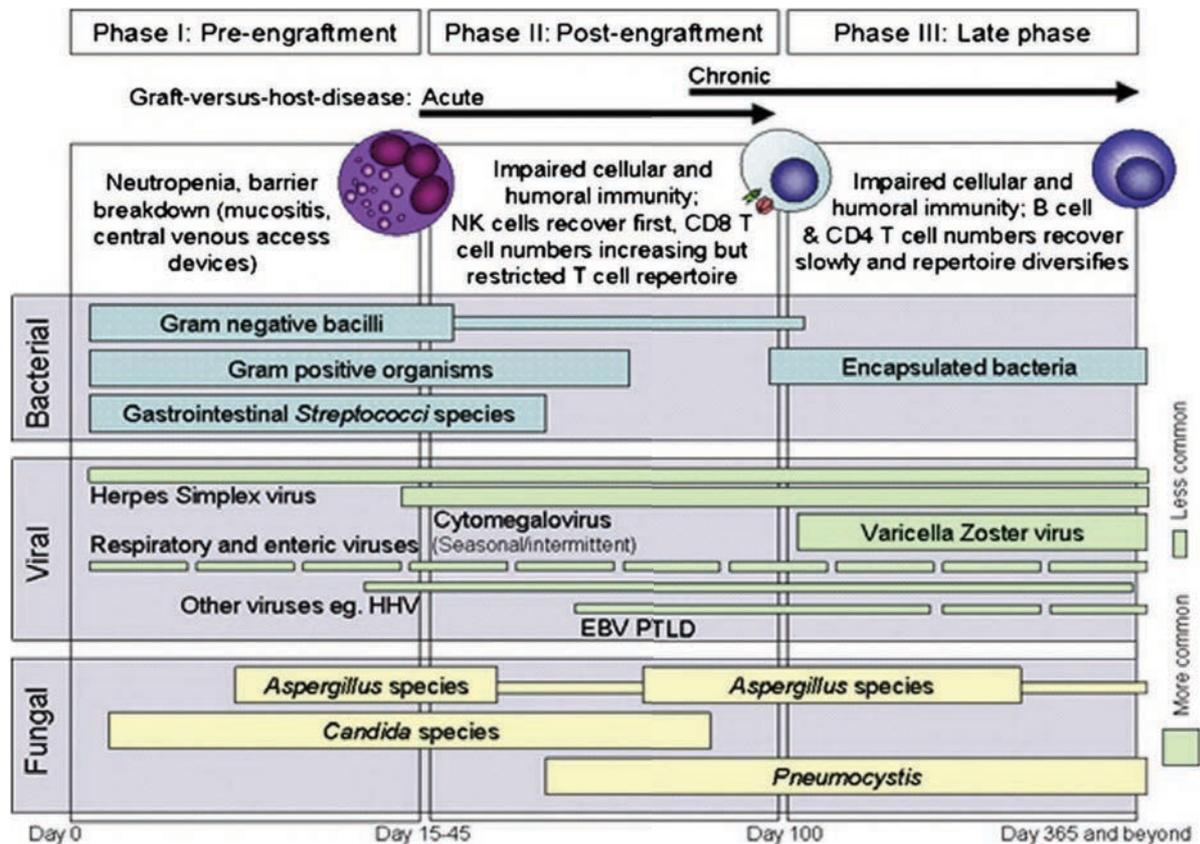


Figure 4. Complications infectieuses induites par la procédure d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Adaptée de Tomblyn *et al.*⁴⁵

II. D. 2. Complications tardives

Les chimiothérapies administrées durant l'induction, les consolidations et l'allo-CSH peuvent engendrer des complications plusieurs mois, voire plusieurs années après la guérison du patient. Des cancers secondaires induits par la radio-chimiothérapie et l'immunodépression post-allogreffe peuvent survenir. Le plus fréquent est le carcinome basocellulaire, nécessitant une surveillance dermatologique annuelle. Des troubles

endocriniens sont fréquents (stérilité, dysthyroïdie, syndrome métabolique ou ostéoporose précoce liée aux corticothérapies prolongées). Des atteintes d'organes peuvent survenir (cardiomyopathie dilatée imputée aux anthracyclines, insuffisance rénale due aux immunosuppresseurs, hépatites secondaires à la surcharge martiale et la GvH chronique). Des surinfections bronchiques virales ou bactériennes, en lien avec la GvH pulmonaire chronique responsable de broncho-pneumopathies obstructives.

II. D. 3. La réaction du greffon contre l'hôte

La réaction du greffon contre l'hôte correspond à l'expression clinique de l'alloréactivité des LcT du donneur vis-à-vis des antigènes de l'hôte (receveur), présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) à l'origine de dommages tissulaires. Elle constitue l'obstacle principal à la pratique de l'allogreffe. Elle a été décrite initialement à partir de modèles murins : suite à l'administration d'un greffon non compatible, on note l'apparition, d'un syndrome dit « secondaire » se manifestant par une prostration, une fourrure ébouriffée et une perte de poids³¹. Ces souris étaient guéries de la leucémie mais mourraient de ce qui sera appelé plus tard la réaction du greffon contre l'hôte. Initialement, on considérait qu'une GvH survenant dans les 100 premiers jours suivant la greffe était aiguë et chronique au-delà.

Depuis l'avènement des conditionnements d'intensité réduite et des injections de lymphocytes du donneur, les cliniciens ont été confrontés à la survenue de GvH aiguë au-delà des 100 jours nécessitant l'actualisation de cette définition. On parle désormais de « late onset GvH » en cas de GvH aiguë tardive et « d'overlap syndrome » ou syndrome de chevauchement lorsque les signes cliniques de GvH aiguë et GvH chronique sont concomitants⁵⁰. La GvH aiguë touche entre 40 et 50% des patients allogreffés, mais sa fréquence varie en fonction de la compatibilité HLA entre le donneur et le patient. Plus le greffon est incompatible, plus le risque de GvH aiguë est important^{51,52}. De même, la GvH

chronique touche 40% des patients sachant que son principal facteur de risque est la GvH aiguë.

III. La réaction aiguë du greffon contre l'hôte

III. A. Diagnostic

Les manifestations cliniques de la GvH aiguë sont essentiellement cutanées (rash et dermatite) et/ou hépatiques (hépatite cholestatique) et/ou digestives (diarrhées et douleurs abdominales). La première classification de la GvH aiguë a été proposée par Glucksberg *et al.* évaluant l'atteinte cutanée, hépatique et digestive par un stade allant de 1 à 4. Le grade de la GvH est ensuite évalué en combinant les stades des différents organes ^{53,54}.

Stades de la GvH aiguë

Stades	Peau	Tube digestif	Foie
1	< 25% de la surface corporelle	Diarrhées >500 mL/j	Bilirubine 10-30 mg/L
2	de 25% à 50 % de la surface corporelle	Diarrhées > 1000 mL/j	Bilirubine 30-60 mg/L
3	Eruption généralisée	Diarrhées >1500 mL/j	Bilirubine de 60-150 mg/L
4	Epidermolyse bulleuse	Douleurs abdominales sévères voire Iléus	Bilirubine > 150 mg/L

Grades de la GvH aiguë

Grades	Peau	Tube digestif	Foie	Etat général
I	1 à 2	0	0	Conservé
II	1 à 3	1	1	Altération mineure
III	2 à 3	≥2	≥2	Altération modéré
IV	≥ 2	≥2	≥2	Altération sévère

Tableau 2-3. Stades et grades de la GvH aiguë selon Glucksberg *et al.* actualisés par Przepiorka *et al.* ^{53,54}.

L'atteinte cutanée est de loin la plus fréquente. Sa présentation est polymorphe, allant du simple rash cutané localisé à la paume et à la plante des pieds, à l'épidermolyse bulleuse avec décollement cutané généralisé, mimant un syndrome de Lyell. Différents stades ont été définis en fonction de son extension. L'éruption n'étant pas typique, une biopsie avec une analyse histologique est parfois nécessaire avec un bilan complémentaire afin d'éliminer une autre étiologie le plus souvent virale ou médicamenteuse.

L'atteinte digestive est moins apparente initialement. Sa survenue dans un contexte d'atteinte cutanée facilite le diagnostic. Elle se manifeste le plus souvent par des diarrhées verdâtres dans un contexte de colite, voire d'iléus et de signes digestifs non spécifiques (anorexie, douleurs abdominales, vomissements). Sa gravité est évaluée sur le volume de selles quotidiennes à partir 500 mL/j de diarrhée pour le stade 1 jusqu'à l'iléus pour le stade 4. Cependant, le diagnostic reste problématique notamment du fait des autres étiologies possibles liées à la toxicité du conditionnement, des médicaments ou encore aux infections. Des examens complémentaires sont habituellement nécessaires tels que la recherche du *Clostridium difficile* dans les selles et du CMV par PCR dans le sang qui constituent les deux principales causes de diarrhées aiguë post-greffe. Idéalement, une exploration invasive endoscopique par voie haute et la réalisation de biopsie mettant en évidence une infiltration lymphocytaire, la présence de corps apoptotiques avec une diminution, voire une disparition des cryptes, confirmera le diagnostic de GvH digestive. Cependant l'atteinte est le plus souvent grêlique avec une prédominance sur l'iléon terminal qui reste difficilement accessible à l'endoscopie chez des patients le plus souvent altérés. C'est pourquoi des méthodes de diagnostic indirectes non-invasives ont vu le jour : La vidéo-capsule semble être plus sensible que l'endoscopie et permet en cas de GvH digestive de cartographier l'atteinte de l'ensemble du grêle et suivre l'évolution au cours du traitement immunosuppresseur⁵⁵.

La GvH hépatique est souvent difficile à objectiver et accompagne souvent l'atteinte digestive. Les stades sont définis par le taux de bilirubine du stade I < 30 mg/L au stade 4 > 150 mg/L. Sa suspicion justifie l'exclusion des médicaments hépatotoxiques, la

réalisation d'une PCR CMV dans le sang, et d'une échographie hépatique afin de ne pas méconnaître une maladie veino-occlusive (MVO) ou une anomalie des voies biliaires. La biopsie hépatique entérinera définitivement le diagnostic.

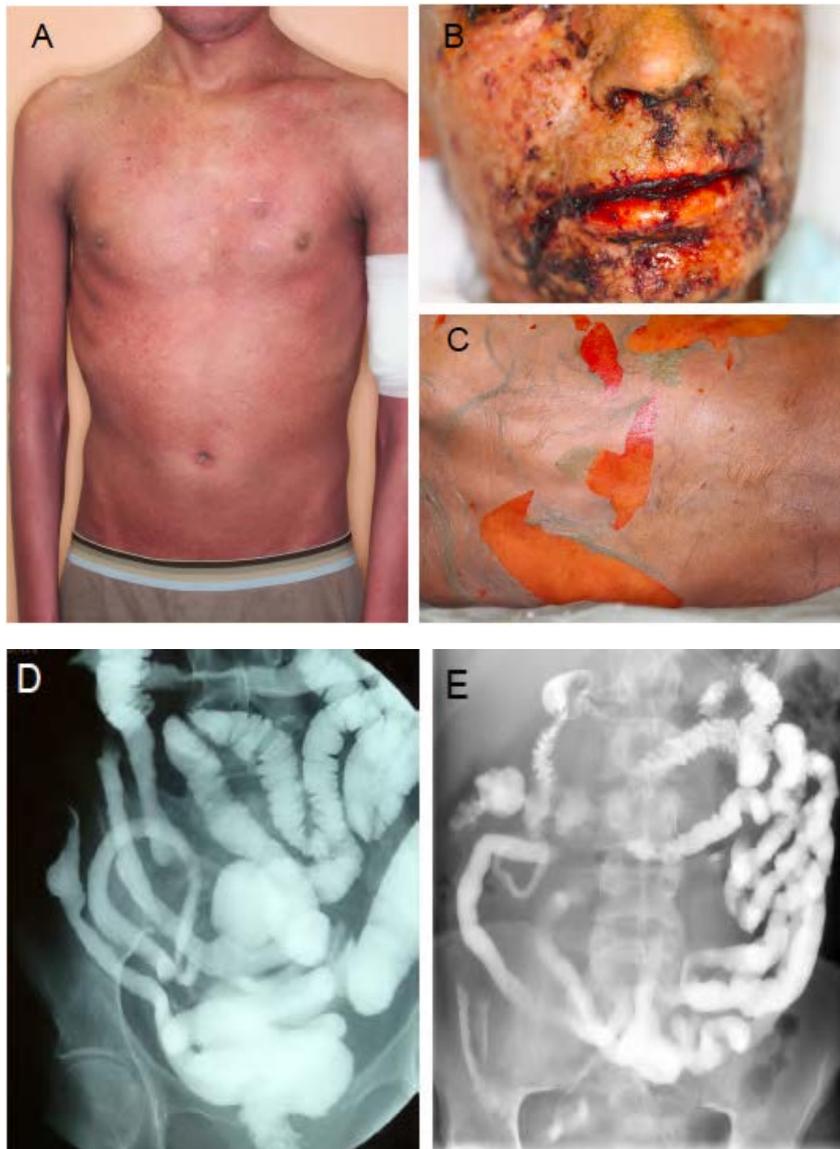


Figure 5. Illustrations de GvH aiguë cutanée et digestive.

A. Eruption cutanée de type d'érythrodermie généralisée. B et C. Atteinte cutanée avec présence d'ulcérations et d'une épidermolyse. D et E. Transit du grêle mettant en évidence une diminution de la lumière iléale en faveur d'un épaississement de la paroi intestinale. Photos fournies par le Docteur Leonardo Magro et le Professeur David Seguy (CHU de Lille).

III. B. Physiopathologie

Le développement de la GvH aiguë nécessite la coexistence de différentes conditions énoncées par Billingham *et al.* en 1966 : 1. le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes ; 2. le patient doit être suffisamment immunodéprimé pour ne pas rejeter le greffon ; 3. le patient doit exprimer des gènes d'histocompatibilité différents de ceux du donneur. Un quatrième critère a été précisé ultérieurement à savoir la migration des cellules immunocompétentes du donneur vers les tissus cibles⁵⁶.

Outre ces conditions indispensables à la survenue d'une GvH aiguë, l'étude de sa physiopathologie à partir d'un modèle murin mis au point par Ferrara *et al.* a révélé l'importance de l'atteinte du tube digestif dans l'amplification de la GvH aiguë. Son mécanisme peut être résumé en trois phases: 1. le conditionnement provoque des dommages tissulaires responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α en particulier) et d'une translocation intestinale microbienne; 2. le TNF- α active la présentation des antigènes de l'hôte par les CPA *via* le CMH et contribue à stimuler l'alloréactivité des LcT du donneur ; 3. La cytotoxicité des LcT activés aggrave les dommages muqueux et majore la translocation d'agents microbiens ou pathogènes associated molecular patterns (PAMP) tels que le lipopolysaccharide (LPS), qui favorisent l'emballement du processus^{57,58,59}.

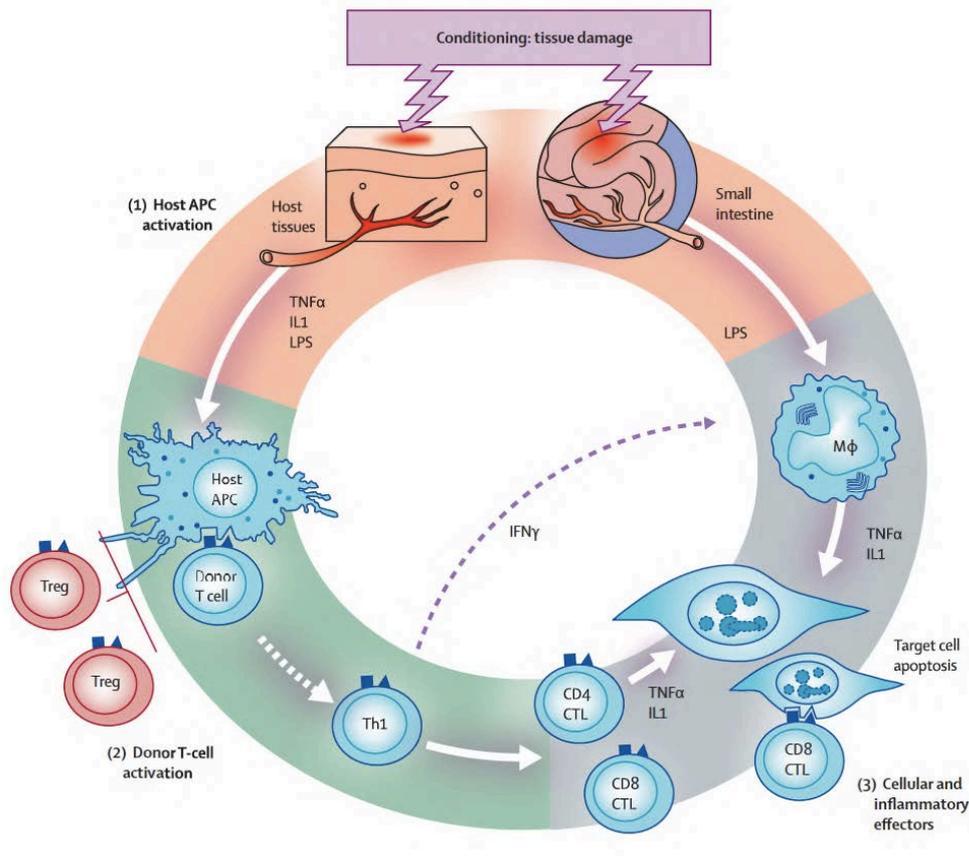


Figure 6 : Physiopathologie de la GvH aiguë. Adaptée de Ferrara *et al.*⁶⁰.

III. B. 1. Etape 1 : Activation des cellules de l'hôte.

La sévérité de la GvH aiguë augmente avec l'intensité du conditionnement qui précède la greffe⁶¹. L'irradiation corporelle totale comme la chimiothérapie vont engendrer une stimulation des macrophages localisés dans la muqueuse intestinale et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 qui stimule l'expression des molécules du CMH à leur surface⁶². De façon concomitante, les dommages de la muqueuse intestinale vont provoquer une translocation de dérivés microbiens (PAMPS).

III. B. 2. Etape 2 : Activation des CPA et des cellules du donneur.

Les PAMPS vont être reconnus par les récepteurs nommés Pattern recognition receptor (PRR) tels que les Toll-Like receptor (TLR) à la surface des macrophages du

patient qui vont être activés et sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires⁶³. Avec l'injection du greffon, les LcT du donneur vont être mis en contact avec les molécules HLA des cellules présentatrices d'antigènes activées du patient et vont pouvoir exprimer leur alloréactivité⁶⁴. Ces cellules vont se différencier en LcT CD4 qui vont sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires responsables du recrutement et de la prolifération des LcT CD8. Les CPA du donneur vont également présenter les antigènes du patient provenant des cellules détruites et par réaction croisée entretenir et aggraver le phénomène⁶⁵.

III. B. 3. Etape 3 : Destruction des tissus cibles

Les LcT du donneur et les macrophages circulants activés vont ensuite migrer vers les tissus cibles tels que la peau, le foie et le tube digestif⁶⁶. Les LcT CD8 sont capables de stocker dans leur cytoplasme du granzyme et de la perforine, qui au contact des cellules étrangères vont être relargués et créer des pores dans la membrane de ces cellules permettant l'entrée du granzyme, provoquant la mort cellulaire par apoptose⁶⁷. Les LcT CD4 stimulent quant à eux préférentiellement la voie FAS/FAS ligand permettant l'activation de la voie de signalisation des caspases à l'origine de la mort cellulaire par apoptose⁶⁸. Enfin, les cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 sécrétées par les macrophages et les lymphocytes peuvent également entraîner la mort cellulaire⁶⁹. L'ensemble de ces cellules effectrices est à l'origine d'un orage cytokinique qui aggrave localement les dommages tissulaires. Ces dommages augmentent à leur tour la perméabilité intestinale et la translocation microbienne à l'origine de l'amplification de la GvH aiguë. Au-delà de la réaction allo-immune, la barrière intestinale joue par conséquent un rôle central dans l'initiation et l'amplification de la GvH aiguë.

III. C. Traitement de la réaction aiguë du greffon contre l'hôte

III. C. 1. Prophylactique

Etant donné le caractère rapidement évolutif et potentiellement mortel de la GvH aiguë, la prophylaxie est essentielle.

Le premier traitement a été proposé dans les années 80 : le méthotrexate seul (MTX) puis couplé (15 mg à J1, J6 et J15) à un inhibiteur des calcineurines, la ciclosporine (CsA) a permis d'améliorer significativement la survie des patients⁷⁰. Une alternative à la CsA a été proposée dans les années 1990 avec le tacrolimus en association avec le MTX qui permettait une diminution de l'incidence de la GvH aiguë grade II-IV, sans impact sur la survenue de la rechute ou la survie post-greffe⁷¹. Le mycophénolate mofétil (MMF) en association avec la ciclosporine ont une action synergique avec une meilleure tolérance que le MTX entraînant une diminution de la sévérité de la mucite⁷². Cette association est largement utilisée dans les allo-CSH à conditionnement réduit. Plus récemment les inhibiteurs de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) ont été proposés comme une alternative au MTX en association avec les inhibiteurs de calcineurine et ont permis de limiter l'incidence de la GvH aiguë sans améliorer la survie⁷³.

En complément des immunosuppresseurs, la manipulation du greffon occupe désormais une place importante dans la prévention de la GvH aiguë. La T déplétion *in vivo* avec l'utilisation du sérum anti-lymphocytaire injecté à J-3 et J-2 a permis de réduire significativement l'incidence de la GvH aiguë et d'améliorer la survie^{74,75}. Enfin, l'utilisation de l'endoxan post-greffe à J3 et J4 dans les greffes haplo-identiques a participé à leur succès avec des résultats similaires à la greffe phéno-identique en terme de survie^{38,39,76}.

III. C. 2. Curatif

Le traitement de première intention repose sur l'utilisation de glucocorticoïdes. La GvH aiguë cutanée de grade I est traitée en première intention par glucocorticoïdes

topiques. Les GvH aiguë de grade II à IV sont d'emblées traitées par glucocorticoïdes intraveineux à la dose de 2 mg/kg/j associés à la poursuite de la ciclosporine^{77,78}. La décroissance est initiée dès lors que les symptômes s'amendent avec des diminutions de doses très progressives. Dans près de 50% des cas, la GvH aiguë va être cortico-résistante, définie par une évolution défavorable dans les 3 jours ou une stabilité des symptômes 5 à 7 jours après l'initiation du traitement, ce qui rend le pronostic défavorable avec une survie globale de 5 à 30%. Des associations ont été envisagées afin d'améliorer la réponse aux corticoïdes. Une étude randomisée comparant corticoïde seul vs. corticoïde + MMF n'a pas montré d'amélioration⁷⁹.

Devant une GvH aiguë cortico-résistante un traitement de deuxième ligne doit être instauré. De nombreux agents ont été proposés notamment le MTX, le MMF, les anti-IL2, le denileukin difitox, les anti TNF- α . Mais du fait du manque d'études randomisées, aucune standardisation n'est validée en traitement de deuxième ligne⁸⁰. Des résultats convaincants ont été obtenus avec le ruxolitinib avec une survie estimée à 79% à 6 mois pour des GvH aiguë cortico-résistantes⁸¹. Une étude prospective est actuellement en cours pour confirmer ces résultats⁸².

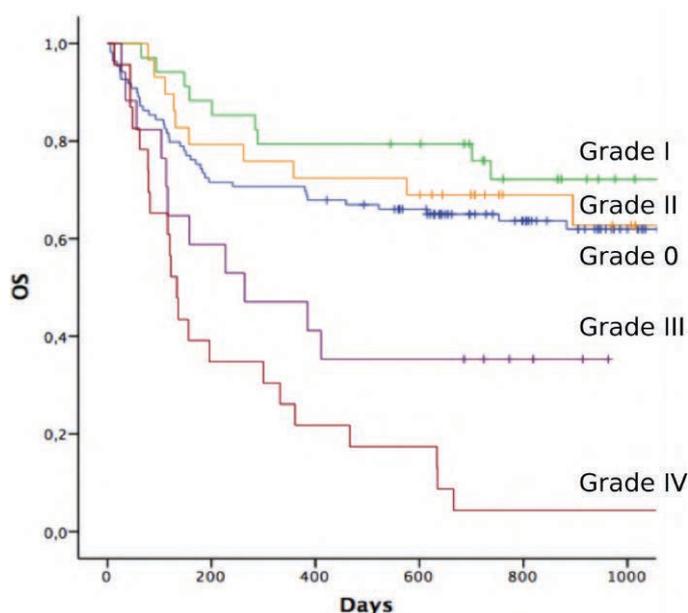


Figure 7. Courbe de survie en fonction du grade de la GvH aiguë au CHU de Lille entre Janvier 2013 et Juillet 2015. OS : Overall survival. (n = 212). D'après Hueso *et al.* Données non publiées.

IV. La réaction chronique du greffon contre l'hôte

Le mécanisme de la GvH chronique est différent de la GvH aiguë et s'apparente plutôt aux maladies auto-immunes telles que la sclérodermie ou le syndrome de Gougerot Sjögren. Comme pour la GvH aiguë, la GvH chronique semblerait liée à la reconnaissance des tissus et organes du receveur par les cellules du donneur.

Tous les organes peuvent être atteints mais ce sont principalement l'atteinte cutanée, buccale, hépatique, oculaire ou encore pulmonaire qui sont au premier plan. Sa survenue peut être progressive (continuum entre la GvH aiguë et GvH chronique), quiescente (apparition suite à une GvH aiguë résolutive) ou de novo (apparition d'une GvH chronique sans GvH aiguë au préalable). L'incidence de la GvH chronique varie en fonction de plusieurs paramètres liés à l'allo-CSH, à savoir : le degré d'incompatibilité du greffon, de la source du greffon, ou encore l'âge du patient⁵². Elle peut atteindre 70% des patients et survient en général dans les 3 ans suivant l'allo-CSH.

A l'instar de la GvH aiguë, le diagnostic est clinique mais une confirmation histologique est généralement nécessaire. Avant tout traitement, la gravité et l'étendue de la GvH chronique doit être appréciée. La première classification a été proposée par l'équipe de Seattle en 1980 et classait la GvH chronique comme limitée ou extensive. Les recommandations du NIH proposent un score plus précis classant la GvH chronique en 3 groupes : légère, modérée ou sévère^{50,83}.

Le traitement est adapté à sa sévérité. Dans les formes limitées et selon l'organe atteint, cela peut être des mesures simples associées à un traitement topique^{84,85,86}. Pour les formes modérées à sévères, le recours à la prednisone 1mg/kg/j est nécessaire avec une décroissance progressive pouvant être associée aux inhibiteurs des calcineurines. La corticorésistance est définie par une progression à 2 semaines de traitement, une stabilité à 4-8 semaines une absence de guérison à 3 mois ou, une impossibilité de sevrage. Dans ce cas un traitement de deuxième ligne doit être envisagé. Bien que différentes options soient disponibles, il n'existe à ce jour aucun traitement validé par un essai clinique

contrôlé. Le choix se fait donc au cas par cas, en tenant compte des organes atteints, des toxicités et interactions médicamenteuses potentielles.

Quel que soit le traitement utilisé, des mesures associées doivent être instaurées du fait notamment de la corticothérapie au long cours. La GvH chronique reste ainsi une problématique majeure de l'allo-CSH entraînant une altération de la qualité de vie des patients. Comme pour la GvH aiguë, de nouvelles stratégies thérapeutiques avec la mise au point de biomarqueurs précoces et la validation de traitement de deuxième ligne sont nécessaires afin d'améliorer la prévention et la prise en charge de la GvH chronique.

Manifestations cliniques de la GVH chronique

Organe	Diagnostiques	Distinctives	Autres	Communes avec GVHD aiguë
Peau	Poikilodermie, lichen plan ou scléreux, sclérose profonde, morphee	Dépigmentation (vitiligo), lésions papulosquameuses	Hypopigmentation, hyperpigmentation, kératose pileaire, ichtyose, défaut de transpiration	Erythème, rash maculopapuleux, prurit
Ongles		Dystrophie, onycholyse, perte d'ongle, <i>pterygium unguis</i>		
Cuir chevelu et pilosité		Alopécie	Cheveux irréguliers/fins/ternes, grisonnage prématuré	
Bouche	Lichen plan	Xérostomie, mucocèle, atrophie muqueuse, pseudomembranes, ulcérations		Gingivite, mucite, érythème, douleur
Yeux		Xérophtalmie, kératoconjonctivite sèche, kératopathie ponctuée	Hyperpigmentation périorbitaire, photophobie, blépharite	
Tractus génital	Lichen plan ou scléreux Femme : sténose vaginale, fusion labiale/clitoridienne Homme : sténose méatale/urétrale, phimosis	Érosions, fissures, ulcères		
Tractus gastro-intestinal	Stricture/sténose du tiers supérieur ou moyen de l'œsophage		Insuffisance pancréatique exocrine	Anorexie, nausées/vomissements, diarrhée, perte de poids, troubles de croissance
Foie				Élévation de la bilirubine totale, des FAL et des ALAT > 2x les valeurs normales
Poumons	Bronchiolite oblitérante	Air piégé et bronchiectasies observés sur le CT-scan thoracique	COP, restriction pulmonaire	
Muscles, fascia et articulations	Fasciite, raideur articulaire ou contractures	Myosite, polymyosite	Œdèmes, crampes, arthralgies/arthrites	
Hémato			Thrombopénie, éosinophilie, lymphopénie, hypogammaglobulinémie, auto-Ac	
Autres			Épanchements péricarde/plèvre/ascite, syndrome néphrotique, PNP, myasthénie, Raynaud, cardiopathie, troubles de conduction	

D'après Jagasia et al., *Biol Blood Marrow Transplant* [12].

Tableau 4. Manifestations cliniques de la GvH chronique. D'après Magro *et al.*⁸⁷ adapté de Jagasia *et al.*⁸³

In fine, le traitement de la LAM et notamment en cas de recours à une allo-CSH, s'accompagne de multiples complications. Parmi elles, les infections et la GvH aiguë restent les principales complications responsables de la mortalité post-allogreffe. Malgré des progrès importants réalisés avec le développement des conditionnements à intensité réduite, des anti-infectieux et des soins de support, une meilleure prévention de ces complications devrait permettre d'améliorer la survie et la qualité de vie de ces patients⁸⁸. Dans ce contexte, le renforcement de la barrière intestinale apparaît comme une alternative prometteuse.

V. La Barrière intestinale

V. A. Définition

De la bouche à l'anus, la muqueuse digestive représente une surface d'échange entre l'organisme et le milieu extérieur bien plus important que la surface cutanée. La muqueuse intestinale assure deux rôles essentiels. D'une part, l'absorption des macro/micronutriments pour l'intestin grêle, et de l'eau et électrolytes pour le côlon. D'autre part, la protection de l'organisme vis-à-vis de la pénétration des agents microbiens potentiellement pathogènes tout au long du tractus digestif. La muqueuse intestinale se comporte donc comme une barrière sélective indispensable à la survie de l'organisme. Ces actions coordonnées sont le résultat d'interactions dynamiques entre les différents constituants de cette barrière permettant de maintenir l'homéostasie. Diverses pathologies peuvent rompre cet équilibre telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn), le diabète, l'obésité. Il en va de même avec les chimiothérapies (et l'éventuelle irradiation corporelle totale) utilisées dans le traitement des LAM (induction, consolidation, conditionnement de greffe) et plus encore avec la GvH aiguë qui peut s'apparenter par certains aspects aux maladies inflammatoires de l'intestin⁸⁹. Parmi les différents acteurs impliqués dans cet effet de barrière, trois jouent un rôle majeur : l'épithélium intestinal, le mucus et le microbiote intestinal. Ce tryptique entretient des interactions permanentes nécessaires au maintien de l'intégrité de la barrière intestinale⁹⁰.

V. B. Composition

V. B. 1. L'épithélium intestinal

L'épithélium grêlique représente une barrière physique entre la couche de mucus et le tissu conjonctif sous-jacent. Il est majoritairement constitué d'entérocytes impliqués dans l'absorption des macro/micronutriments, de cellules caliciformes qui renouvellent de façon

continue le mucus intestinal, de cellules M responsables du passage des micro-organismes vers les cellules immunitaires sous-jacentes et de cellules neuroendocrines. L'épithélium est organisé en villosités qui augmentent la surface d'échange. Le renouvellement cellulaire est en permanence assuré à partir des cryptes intestinales au fond desquelles se trouvent les cellules souches intestinales et les cellules de Paneth qui sécrètent des peptides antimicrobiens. L'ensemble de cet épithélium est donc constitué d'une couche monocellulaire séparée de la *lamina propria* par une membrane basale. Ces cellules sont reliées entre elles par des complexes de jonctions serrées qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la fonction de barrière. La vitesse de renouvellement rapide de cet épithélium entérocytaire qui est de 4 à 5 jour chez l'homme, rend l'intestin très sensible aux effets de la radio/chimiothérapie⁹¹.

A la différence de l'épithélium grêlique, l'épithélium colique est organisé en cryptes et n'a pas de villosités. Ces cryptes sont essentiellement composées de cellules caliciformes, de colonocytes et de rares cellules neuroendocrines. A noter que la concentration en cellules caliciformes augmente à mesure que l'on progresse dans le côlon. De part l'abondance et la diversité de son microbiote, le côlon est un haut lieu de métabolisme et de fermentation, permettant de récupérer notamment l'énergie des glucides non absorbés par le grêle. Ainsi, lactose, fructose et polysaccharides d'origine alimentaires sont hydrolysés par les bactéries anaérobies conduisant à la formation d'acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que le butyrate, l'acétate ou le propionate. Ces AGCC jouent plusieurs rôles notamment dans l'homéostasie colique : ils permettent de fournir de l'énergie aux colonocytes, favorisent l'absorption d'eau et d'électrolytes et influencent le tonus colique. Un effet trophique est également décrit, avec une augmentation de la profondeur des cryptes et du nombre de colonocytes⁹². Enfin ils sont impliqués dans la réduction de la prolifération et l'adhésion d'agents entéro-pathogènes tel que *Salmonella typhimurium*⁹³. Ils auraient également des propriétés anti-inflammatoires en modulant l'expression du facteur de transcription nucléaire NF- κ B⁹⁴.

V. B. 2. Le mucus intestinal

Le mucus est un gel viscoélastique complexe qui tapisse l'ensemble de l'épithélium digestif à l'interface entre l'épithélium et le microbiote de la lumière intestinal. Il est essentiellement composé d'eau et de macromolécules hautement glycosylées et hydrophobes, appelées mucines. Elles sont au nombre de 5 chez l'homme : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19. Les mucines sont des protéines de haut poids moléculaire, très bien conservées au cours de l'évolution des mammifères. Elles sont toutes composées d'un squelette protidique appelé apomucine et de chaînes glucidiques reliées par des liaisons O-glycosylées aux résidus sérine, thréonine et proline du peptide appelé région STP. Au sein des Mucines MUC2, MUC5AC et MUC5B, les régions S/T/P sont interrompues par des domaines cystéine appelés domaines CYS. La mucine intestinale prédominante est la mucine MUC2⁹⁵. Elle est produite de façon continue par les cellules caliciformes au sein de l'appareil de Golgi puis au niveau réticulum endoplasmique où elle va subir différentes étapes de glycosylation. Elle est ensuite stockée dans des granules sous-apicaux d'où elle sera libérée dans la lumière intestinale⁹⁶.

Les propriétés physico-chimiques de ce gel vont lui permettre d'assurer plusieurs fonctions au sein du tractus digestif. Au niveau de la bouche, il permet la lubrification du bol alimentaire et son passage vers l'œsophage. Dans l'estomac, il protège la muqueuse des agressions liées au pH acide. Dans l'intestin grêle, il permet l'absorption des nutriments par les entérocytes, tandis qu'il constitue une barrière physique vis-à-vis des agents microbiens intraluminaux⁹⁷. Dans le côlon, il est constitué de deux gels distincts organisés en de nombreuses sous-couches qui facilitent le transit des selles et limitent la colonisation bactérienne⁹⁸. Il constitue tout au long du tractus digestif, une niche écologique pour la flore microbienne adhérente⁹⁹.

V. B. 3. Le microbiote intestinal

Le tube digestif abrite 10^{14} micro-organismes, soit 10 fois le nombre de cellules eucaryotes qui composent notre organisme. Le microbiote intestinal regroupe l'ensemble des micro-organismes présent dans le tube digestif. Il est composé essentiellement de bactéries, mais aussi de cellules eucaryotes et de virus¹⁰⁰.

A ses débuts, l'étude du microbiote intestinal reposait uniquement sur la culture du contenu luminal et des tissus. Cette approche ne permettait de mettre en évidence que 30% de l'ensemble du microbiote, du fait que la plupart des bactéries intestinales ne sont ni cultivables, ni identifiables par des techniques basées sur les caractéristiques morphologiques ou biochimiques. L'avènement des techniques de biologie moléculaire et du séquençage de l'ARN ribosomique 16S commun à l'ensemble des bactéries, a permis de mieux identifier la diversité du microbiote. Plus récemment le séquençage de l'ensemble du génome bactérien a mis en évidence la présence de 3,3 millions de gènes non redondants représentant plus de 100 espèces bactériennes^{101,102}.

Bien que le microbiote fécal soit caractéristique d'un individu, 4 grands groupes bactériens ou *phyla* regroupent l'immense majorité des bactéries rencontrées chez l'homme à savoir : *Actinobacteria*, *Firmicute*, *Bactéroidetes* et dans une moindre mesure *Proteobacteria*^{103,104}. Au sein de ces groupes bactériens, les genres dominants retrouvés sont : *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*. La composition du microbiote varie qualitativement en fonction de sa localisation au sein du système digestif mais également quantitativement, allant de 10^2 dans l'estomac à 10^{12} dans le côlon distal^{105,106}. Au niveau buccal et œsophagien, ce sont les bactéries du genre *Streptococcus* et *Veillonella* qui dominent. Au niveau gastro-duodéal et jéjunal la quantité est moindre, avec des bactéries aérotolérantes telles que les streptocoques, les lactobacilles et les levures. Dans l'iléon et surtout le côlon se sont les bactéries essentiellement anaérobies exclusives du genre *Bacteroides* et *Clostridium* et dans une moindre mesure du genre *Bifidobacterium* qui dominent. Les germes anaérobies facultatifs

telles que les entérobactéries avec comme chef de file *Escherichia coli* ou les lactobacilles sont également présentes (Figure 8).

Dans le côlon, le microbiote intervient dans la production d'AGCC. Il contribue à l'absorption des vitamines B12 et K, nécessaires à l'hématopoïèse et à la synthèse de facteurs de coagulation. Il intervient dans la maturation du système immunitaire avec l'induction de T régulateurs. Enfin, le microbiote joue un rôle prépondérant au sein de la barrière intestinale en limitant la colonisation et la translocation de pathogènes¹⁰⁷.

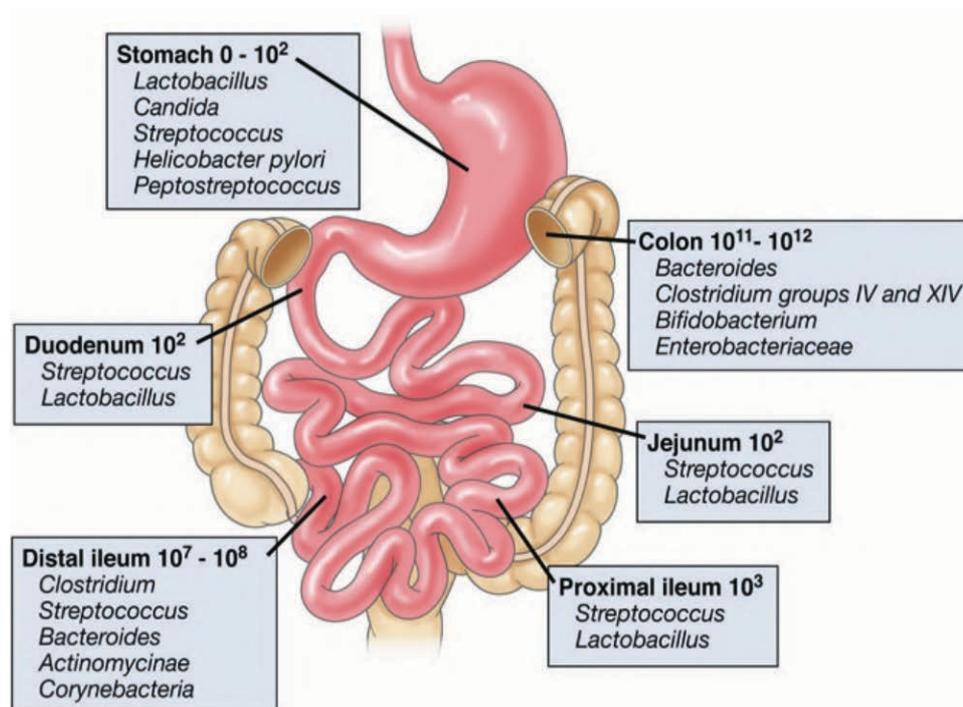


Figure 8. Composition et concentration des espèces bactériennes dominantes dans les différentes régions du tractus digestif. D'après Sartor *et al.*¹⁰⁵

VI. Toxicité de la chimiothérapie sur la barrière intestinale

VI. A. La mucite

L'ensemble de l'épithélium grêlique se renouvelle rapidement : en 4 à 5 jours chez l'homme et 2 à 3 jours chez la souris¹⁰⁸. Le retentissement de la chimiothérapie sur la

barrière intestinale est par conséquent majeur et il a été décrit dès les premières utilisations¹⁰⁹. Les premières descriptions chez l'homme rapportent des symptômes digestifs à type de diarrhées et de nausées dans les suites de l'administration de la chimiothérapie. L'analyse histologique des biopsies fait état d'une atteinte de la muqueuse intestinale avec présence de tissu nécrotique, disparition des cryptes et infiltration par des cellules inflammatoires. Tandis que sa réparation survient dans les 18 jours suivant la fin de la chimiothérapie¹¹⁰. Actuellement, on estime que les patients LAM qui bénéficient d'une chimiothérapie selon le schéma « 3+7 » vont développer une mucite et une diarrhée sévère respectivement dans près de 50 et 70% des cas^{111,112}. L'utilisation de modèles précliniques a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette atteinte. Quels que soient le produit et la dose utilisée, l'atteinte de la muqueuse évolue en 5 phases : 1. initiation ; 2. réponse ; 3. amplification ; 4. ulcération et 5. réparation.

Lors de la phase d'initiation qui survient dans les quelques heures suivant l'administration d'une chimiothérapie, il y a production de radicaux libres liés aux dommages tissulaires et de l'ADN. Lors de la phase de réponse, l'expression de la protéine TP53 et NFκB entraîne l'hyper-expression de gènes pro-apoptotiques tels que BAX et BAK et limite l'expression des gènes anti-apoptotique tels que Bcl-2. S'en suit la phase d'amplification, avec l'ancrage secondaire de BAX au niveau de la mitochondrie. Ce processus induit la libération du cytochrome C qui active secondairement la chaîne des caspases, aboutissant à l'apoptose cellulaire. La phase d'ulcération est liée à la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de métalloprotéases à l'origine de la destruction tissulaire et de la perte de l'intégrité de la barrière. La colonisation, voire la translocation de bactéries entretiennent le phénomène pro-inflammatoire. Enfin, dans les 2 à 3 semaines suivant le jour de l'arrêt de la chimiothérapie, des signaux de la matrice extracellulaire permettent localement de stimuler la prolifération cellulaire à partir des cryptes et de réparer les tissus lésés^{113,114,115,116}.

Les travaux de Elting *et al.* ont mis en évidence, tout cancer confondu, la survenue d'une mucite orale ou digestive dans 37% des cas suite à l'administration d'une

chimiothérapie. Celle-ci était très bien corrélée à la survenue d'une pancytopenie, mais également à la survenue d'une infection. Du fait de la nécessité de soins de support (administration de produits sanguins, d'antibiotiques et d'antalgiques morphiniques) et de la prolongation de la durée de séjour, on estime que la présence d'une mucite génère un surcoût de 3500 dollars par patient et par cycle de chimiothérapie¹¹⁷.

VI. B. Evaluation de la perméabilité intestinale

Une des conséquences de l'atteinte entérocytaire réside dans l'altération de la perméabilité intestinale par atteinte des jonctions serrées¹¹⁸. Cette augmentation de la perméabilité suit la phase d'amplification et s'étend sur plusieurs jours, dépassant largement la durée du renouvellement du tissu épithélial. En outre, il est probable que la réduction des ingesta oraux participe à l'atrophie villositaire et à l'altération de cette perméabilité¹¹⁹. En effet, diverses études montrent que l'apport entéral de nutriments, en particulier des acides aminés contenus dans les protéines tels que la glutamine, jouent un rôle déterminant dans la fonction de barrière de l'intestin^{120,121}. Deux études suggèrent d'ailleurs qu'un apport oral de glutamine (l'aliment préférentiel des entérocytes) diminue le risque de GvH aiguë chez l'homme¹²².

Au-delà des troubles digestifs et de la fièvre qui peuvent être concomitants (douleurs abdominales, diarrhée, vomissements), la perméabilité intestinale et le risque de translocation digestive sont évalués de façon indirecte. Les tests d'absorption après évaluation du taux d'excrétion urinaire suite à l'absorption différentielle de lactulose/mannitol, de divers polymères de polyéthylène glycol ou de Cr-EDTA ont permis de quantifier cette perméabilité^{123,124}. Ces tests, bien que pouvant varier avec la vitesse du transit intestinal, la fonction rénale ou encore la vidange gastrique ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale à partir du 2^{ème} jour de chimiothérapie (conditionnement de greffe). Cette augmentation atteint son maximum à 7 jours puis diminue pour se normaliser au bout d'un mois. Ces données suggèrent que les jonctions

serrées semblent endommagées dès la phase d'amplification par les cytokines relarguées avec une sidération des cryptes dans les 48 premières heures suivant l'administration de la chimiothérapie^{125,118}. Bien que représentatif de la perméabilité intestinale chez les patients bénéficiant d'une chimiothérapie d'induction, ces tests demandent une parfaite compliance du patient, avec des biais de mesure liés à la vitesse du transit et la fonction rénale et ne sont par conséquent pas réalisés en pratique¹²⁶.

Les progrès de la biochimie et les données de la recherche clinique ont permis de mettre en évidence un biomarqueur de la trophicité de l'intestin grêle : la citrulline. Cet acide aminé non protéique quasiment absent de l'alimentation, est synthétisé au niveau des mitochondries de l'entérocyte, à partir de la glutamine fournie par l'alimentation. L'immense majorité de la citrulline produite est transformée en arginine au niveau du rein permettant la synthèse de monoxyde d'azote nécessaire à la vasodilatation mais aussi à la synthèse protidique (Figure 9).

Etant donné l'absence de réserve et une demi-vie courte de 3 à 4 heures, la citrulline est utilisée comme un marqueur sensible indirect de la masse entérocytaire fonctionnelle. Les études menées chez les patients atteints d'un syndrome du grêle court consécutif à une chirurgie de résection ont permis d'individualiser la citrulline plasmatique comme un biomarqueur pronostic. Un taux plasmatique inférieur à 20 $\mu\text{mol/L}$ deux ans après leur dernière chirurgie de résection intestinale permet de définir une insuffisance intestinale définitive et une dépendance à la nutrition parentérale¹²⁷.

Depuis ces premiers travaux, l'intérêt du dosage plasmatique de la citrulline a été validé dans de nombreuses pathologies graves telles que l'atrophie villositaire ou l'entérite radique. Chez les patients bénéficiant d'une allo-CSH, le taux de citrulline plasmatique lors du conditionnement de greffe apparaît bien corrélé aux tests de perméabilité précédemment validés¹²⁸. Les études menées chez ces mêmes patients ont montré que les taux de citrulline plasmatique diminuent dès le lendemain de l'administration du conditionnement, atteignent un nadir dans les 3 à 7 jours qui suivent, pour se normaliser après 3 semaines^{129,130}. Par ailleurs, une citrulline plasmatique basse est corrélée à la

survenue d'une bactériémie chez les patients en état de choc septique et constitue donc un marqueur indirect de translocation intestinale^{131,132}.

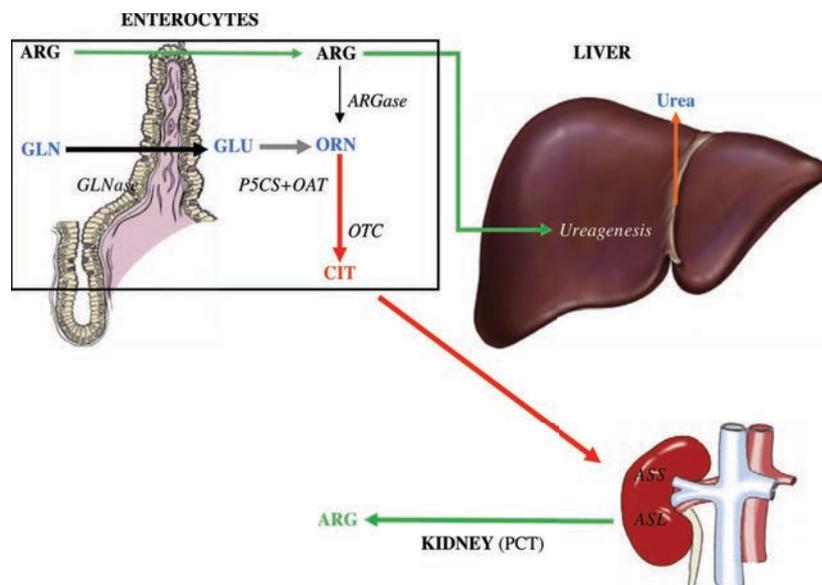


Figure 9. Le cycle de la citrulline. D'après Crenn et *al.*¹³³

VII. Atteinte de la barrière intestinale dans la GvH aiguë

VII. A. Atteinte de l'épithélium

L'atteinte de la barrière intestinale au cours de la GvH aiguë résulte de l'effet du conditionnement relayé par l'effet toxique des cellules alloréactives du donneur sur la muqueuse digestive.

Le conditionnement endommage les cellules souches intestinales. Ces cellules se situant au fond des cryptes intestinales sont porteuses d'un gène nommé LGR 5 (leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) qui permet d'activer la voie Wnt et induire l'ensemble des cellules composant l'épithélium intestinal par migration ascendante. Suite à l'administration du greffon, les cellules alloréactives du donneur vont également limiter le renouvellement du tissu épithélial en détruisant les cellules souches intestinales. Des études récentes ont démontré l'intérêt de l'adjonction d'un agoniste de Wnt, la R-

spondin 1 ou des inhibiteurs de protéines de choc thermique HSP90 (impliquées dans la modulation de la réponse transcriptionnelle lors d'un stress du réticulum endoplasmique) afin de protéger les cellules souches intestinales^{134, 135, 136}.

Parmi les cellules présentes au sein des cryptes, les cellules de Paneth constituent la niche écologique des cellules souches intestinales. Ces cellules ont un rôle dans la régulation du microbiote intestinal par la sécrétion des α -défensines, notamment de REG3 α qui permettent d'éliminer les potentiels pathogènes et de maintenir le microbiote commensal. Elles ont également un rôle dans la sécrétion de signaux permettant la stimulation des cellules souches intestinales. Les études sur modèle murin ont montré que lors de la GvH aiguë, il existe une réduction du nombre de cellules de Paneth entraînant une diminution de la sécrétion de l'ensemble des défensines entériques, mais également une altération du renouvellement des villosités¹³⁷.

La prolifération des cellules de Paneth, la sécrétion des α -défensines mais également la prolifération des cellules souches intestinales sont régulées par l'IL-22 sécrétée par les cellules innées lymphoïdes au sein de la crypte intestinale. Ces cellules découvertes récemment persistent dans la *lamina propria* après la greffe mais sont nettement diminuées en cas de GvH aiguë. Par conséquent, la diminution d'IL-22 engendre une aggravation de la GvH aiguë en limitant la prolifération des cellules souches intestinales, des cellules de Paneth au sein des cryptes intestinales ainsi que la production des peptides antimicrobiens^{138,139}.

Notons que les souris présentant une GvH aiguë ont une perméabilité intestinale bien supérieure aux souris n'en présentant pas. L'étude en immunohistochimie a montré que les jonctions serrées au niveau de l'iléon étaient altérées, de même que l'expression des protéines composant ces jonctions à savoir : l'occludine et la claudine. L'expression de ces protéines est fortement influencée par les phénomènes inflammatoires et en particulier la sécrétion de TNF- α , d'INF- γ et d'IL-13 qui inhibent l'expression des gènes composant les jonctions serrées¹⁴⁰. Il en résulte une augmentation de la translocation de dérivés

microbiens, qui à leur tour activent les macrophages tissulaires sécrétant plus de cytokines pro-inflammatoires entretenant ainsi le phénomène¹⁴¹.

VII. B. La dysbiose

Les travaux réalisés chez la souris dépourvue de germe intestinaux (germ-free) ont montré l'absence de GvH aiguë, même en cas de greffe non compatible avec une survie à 120 jours de 98%. Cette observation vient conforter le rôle de la translocation bactérienne comme évènement fondamental dans la survenue d'une GvH aiguë (Figure 10)¹⁴².

Les premières études randomisées chez l'homme ont comparé des patients atteints d'hémopathie traités dans des chambres standards, sans décontamination intestinale, à des patients traités en chambre à flux laminaire et recevant une décontamination orale. Les résultats n'ont pas montré de différence quant à l'incidence de GvH aiguë, avec cependant une survenue plus tardive dans le groupe traité¹⁴³. Cette étude a été poursuivie sur 133 patients présentant une aplasie médullaire montrant un bénéfice du traitement décontaminant sur l'incidence de la GvH aiguë. Une étude rétrospective en greffe pédiatrique a également montré l'avantage d'une décontamination intestinale complète, comparée à une décontamination sélective (ne ciblant que les bacilles gram négatifs, levures, filamenteux et staphylocoques), sur la diminution de la mortalité liée à la transplantation par la réduction du nombre d'épisodes infectieux et de GvH aiguë¹⁴⁴.

Par la suite, Beelen *et al.* sur une étude rétrospective ont montré que la présence de bactéries anaérobies était associée à la survenue d'une GvH aiguë grade III-IV¹⁴⁵. En outre, la comparaison d'une quinolone présentant un large spectre d'action associée ou non au métronidazole ciblant les bactéries anaérobies, au cours d'un essai clinique randomisé prospectif monocentrique a montré la supériorité de la bi-antibiothérapie et a donc confirmé l'implication des bactéries anaérobies dans la survenue d'une GvH aiguë bien qu'il n'y ait pas de différence significative en terme de survie¹⁴⁶. Si ces résultats sont unanimes, les conditions et l'efficacité des décontaminations digestives sont souvent variables au cours de ces travaux pour la plupart monocentriques.

Les progrès de l'immunologie et de la biologie moléculaire ont permis une meilleure compréhension du microbiote intestinal et de son rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. De manière similaire aux modèles murins de GvH, les souris germ-free ne développent pas de colite inflammatoire et l'introduction secondaire de bactéries aéro et anaérobies peut induire une colite. Les modèles murins avec transfert adoptif de LcT CD4 activés par des dérivés bactériens ont permis d'obtenir un phénotype de colite alors que les souris transférées avec des LcT CD4 activés par un anticorps anti-CD3 ne développaient pas de symptômes, témoignant de l'implication des bactéries dans l'inflammation colique¹⁴⁷.

Par ailleurs, les études ultérieures ont montré que certaines bactéries comme *Bacteroides fragilis* ou encore certaines clostridies pouvaient induire une réponse anti-inflammatoire par activation des LcT régulateurs et la sécrétion d' IL-10 tandis que d'autres dérivés bactériens induisent une réponse pro-inflammatoire par l'activation de la voie Th2 ou Th17^{148,149}.

Les données sur la décontamination digestive, sont basées sur des cultures de selles ne permettant pas d'évaluer l'ensemble des bactéries, notamment les bactéries incultivables telles que les bactéries anaérobies. De plus il était impossible d'évaluer leur abondance relative. Ainsi, les données récentes chez l'homme sur le séquençage de l'ARN 16S bactérien dans les selles au moment de la greffe ont mis en évidence l'impact bénéfique de la diversité microbienne sur la survie¹⁵⁰. Ainsi la présence du genre *Blautia* en post greffe ou encore de la bactérie *Eubacterium limosum* seraient associée à moins de rechute en post greffe en faveur d'un potentiel effet GvL de ces bactérie^{151,152}.

Chez la souris, l'absence de clostridie et de lactobacilles est associée à plus de GvH aiguë et l'administration d'antibiotiques à large spectre tels que les carbapénèmes serait responsable de la diminution des taux de lactobacilles, clostridies et bactéroïdes au profit des entérocoques et de la bactérie *Akkermansia muciniphila*^{153,154}. A l'inverse certains antibiotiques tels que la rifaximin permettraient de maintenir la diversité microbienne et seraient à privilégier lors d'épisode infectieux¹⁵⁵.

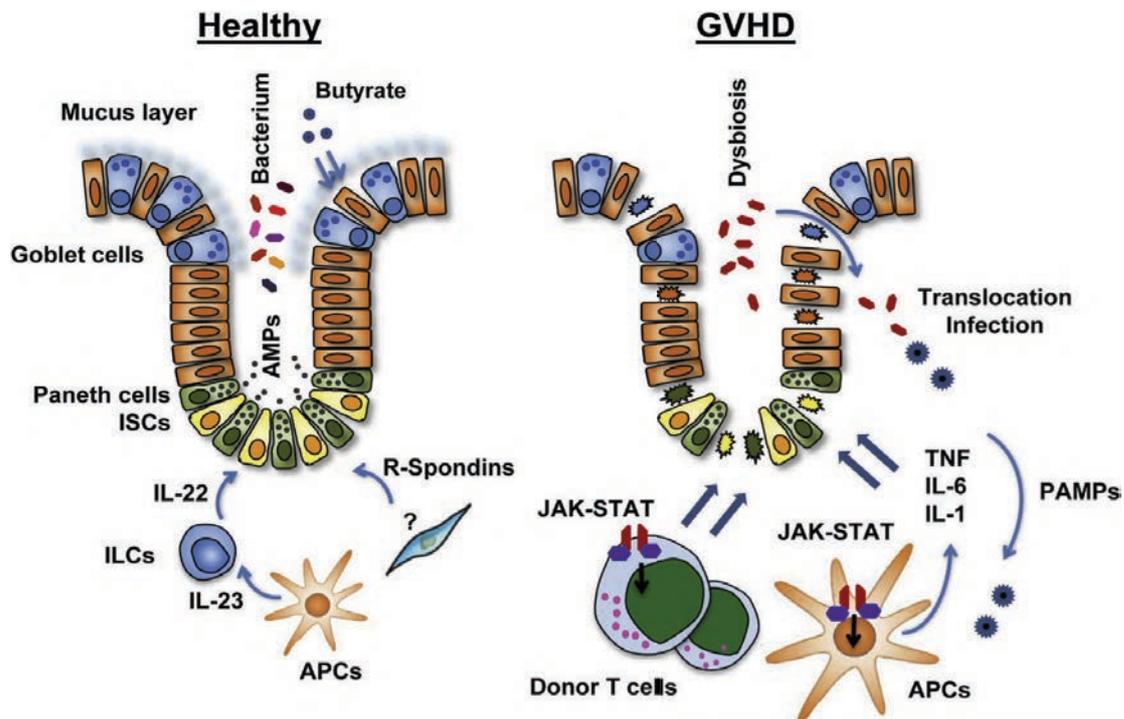


Figure 10. Mécanismes physiopathologiques de l'atteinte de la barrière intestinale lors de la GvH aiguë. APC : Antigen presenting cells ; ISC : Intestinal stem cells ; ILC : Innate lymphoid cell Adapté de Teshima *et al.*¹⁵⁶

VIII. Renforcement de la barrière intestinale

Le renforcement de la barrière intestinale constitue une voie prometteuse dans la prévention et le traitement des dommages induits par la chimiothérapie et la GvH aiguë. Plusieurs approches ont été proposées chez la souris et chez l'homme sans pour autant qu'une seule d'entre elle ne se soit imposée.

VIII. A. Préservation de l'épithélium intestinal

VIII. A. 1. Les approches hormonales

Des stratégies visant à préserver l'épithélium intestinal lors du conditionnement de greffe et à limiter la translocation de PAMPs ont été proposées. Le keratinocyte growth factor (KGF ou palifermin) induit la prolifération des cellules épithéliales notamment celles

de l'épithélium intestinal. Les premiers travaux chez la souris ont confirmé l'intérêt de la palifermin afin de limiter la toxicité intestinale de la radio chimiothérapie¹⁵⁷. Sur modèle murin d'allogreffe, les souris traitées de J-3 à J+7 après le conditionnement, ont une diminution du taux de TNF- α et LPS circulant associée à une GvH aiguë moins sévère ainsi qu'une meilleure survie. Ces résultats suggèrent une amélioration de la trophicité intestinale accompagnée d'une moindre stimulation des cytokines pro-inflammatoires limitant ainsi la réponse allogénique^{158,159}.

Chez l'homme les résultats restent contradictoires en l'absence d'effet sur la GvH aiguë, ou encore sur la survie. On note toutefois un effet bénéfique sur la mucite induite par la chimiothérapie^{160,161,162}. Ce bénéfice a été confirmé secondairement par un essai clinique randomisé prospectif en double aveugle sans complication à long terme^{163,164}.

L'utilisation d'une entéro-hormone intestino-trophique, le Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) a également été proposée afin de maintenir la trophicité de l'épithélium intestinal. En effet, les souris traitées par GLP-2 développent une hypertrophie villositaire avec une augmentation de la profondeur des cryptes^{165,166}.

L'administration de GLP-2 et de GLP-1 à des souris recevant une chimiothérapie limiterait les effets toxiques de celle-ci, mais les résultats restent à ce jour contradictoires, ce d'autant que des effets indésirables telle que la survenue de tumeurs ont été décrits^{167,168,169}.

VIII. A. 2. Les approches cellulaires

Des approches cellulaires ont été élaborées avec l'interleukine l'IL-22 dans des modèles de GvH aiguë. L'IL-22 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-10, au même titre que l'IL-19, IL-20, IL-22 et IL-24. Le rôle de l'IL-22 au cours de la GvH intestinale reste controversé. Les souris KO pour l'IL-22 présentent une GvH intestinale beaucoup plus sévère et ont une survie diminuée. Il en est de même chez les souris dépourvues de cellules lymphoïdes innées (ILC) qui souffrent d'un déficit en IL-22 à

l'origine d'une diminution du taux de cellules souches intestinales (CSI) retentissant sur le renouvellement de la muqueuse intestinale¹³⁸. Inversement, les souris greffées avec des LcT présentant un déficit en IL-22 seraient plus à même de produire des Treg et ainsi de limiter la GvH aiguë tout en conservant leur effet GvL¹³⁹. Cependant, les effets complexes et ambivalents de l'IL-22 rendent son utilisation difficile.

VIII. A. 3. Les approches nutritionnelles

Les travaux de Seguy et *al.* ont montré que, contrairement à une nutrition parentérale, l'instauration d'une nutrition entérale (NE) précoce à J+1, permet de réduire l'incidence et la sévérité de la GvH aiguë et finalement la mortalité précoce, comparée aux patients nourris par une nutrition parentérale. Ces résultats suggèrent que la NE, grâce à son action stimulante sur la trophicité intestinale, limite les dommages intestinaux et la translocation bactérienne à l'origine de la GvH aiguë^{170,171,172,173}.

VIII. B. Renforcement du microbiote intestinal

VIII. B. 1. Les probiotiques

Des approches microbiologiques visant à limiter la dysbiose se sont développées avec l'utilisation de probiotiques. Les probiotiques ont été définis pour la première fois en 1965 comme « une substance sécrétée par un micro-organisme qui favorise la croissance d'un autre organisme »¹⁷⁴. En 2001, l'OMS a affiné cette définition et les décrit comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ».

Parmi les probiotiques, certains sont considérés comme des médicaments pouvant apporter un réel bénéfice dans le traitement ou la prévention d'une maladie. Les résultats obtenus dans les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn sont encourageants¹⁷⁵. *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les mieux documentés. Chez

l'animal, après une chimiothérapie par 5-Fluorouracile, l'administration de probiotiques améliore la colite induite, diminue de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et normalise la profondeur des cryptes comme la taille des villosités¹⁷⁶.

L'administration par voie orale de *Lactobacillus rhamnosus* avant, pendant et après une allo-CSH diminue significativement la mortalité et la prolifération des LcT spléniques, la sécrétion d'INF- γ , la translocation intestinale, et donc l'incidence de la GvH aiguë. Ces données suggèrent une action trophique sur la barrière intestinale et une interaction du microbiote intestinale avec les tissus lymphoïdes sous-jacents¹⁷⁷. Ces données prometteuses n'ont pas été confirmées chez l'homme lors d'un essai randomisé qui n'a pas montré de réduction de l'incidence de la GvH aiguë chez les patients recevant du *Lactobacillus rhamnosus* oral¹⁷⁸.

Plus préoccupant, une étude a rapporté des septicémies provoquées par certains micro-organismes considérés comme des probiotiques chez les patients allogreffés de CSH. Dans l'immense majorité des cas, il s'agissait d'une septicémie à lactobacilles (18 cas sur 19) survenant dans les 100 premiers jours après la greffe et dans près de la moitié des cas il s'agissait de patients présentant une GvH aiguë¹⁷⁹. Aussi, certains cas de septicémies après traitement par *Saccharomyces boulardii* pour prise en charge de diarrhées sont également décrits. Ces cas posent la question de l'administration de probiotiques par voie orale chez des patients immunodéprimés dont la barrière intestinale est altérée¹⁸⁰.

VIII. B. 2. La transplantation fécale

La transplantation fécale est une approche plus récente, initialement utilisée dans le traitement des colites à *clostridium difficile* réfractaires au traitement conventionnel¹⁸¹. Sachant qu'il existe une forte corrélation entre la dysbiose et la survenue d'une GvH aiguë, l'objectif est de rétablir l'équilibre au sein du microbiote intestinale, afin d'entraîner une réponse immunitaire anti-inflammatoire et de contrôler la GvH intestinale.

Les premiers travaux ont évalué la faisabilité de cette technique sur 4 patients présentant des GvH intestinales cortico-réfractaires¹⁸². Secondairement des travaux ont évalué la transplantation fécale via des capsules dispensables par voie orale sur 13 patients confirmant l'innocuité de cette approche avec une restauration de la diversité microbienne et un effet bénéfique sur la préservation des clostridies¹⁸³. Du fait du manque d'essai clinique randomisé, la transplantation fécale doit être discutée au cas par cas en accord avec le patient et l'inclusion dans des essais cliniques doit être privilégiée.

Récemment, cette technique a été testée sur un modèle murin soumis à une forte dose de chimiothérapie par 5 fluorouracile, précédée d'une injection d'amoxicilline. Cette étude mettait en évidence une diminution des clostridies et notamment, *Eubacterium* et *Ruminococcus*, et de certaines bactéries aux vertus anti-inflammatoires telles que *Feacalibacterium prausnitzii* au profit de pathogènes tels que *Citrobacter*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus (E) faecium* et *E. faecalis* et *Escherichia*. La transplantation fécale permettait de restaurer le microbiote intestinal et limiter l'émergence de ces pathogènes¹⁸⁴.

VIII. C. Renforcement du mucus intestinal

VIII. C. 1. La mucine MUC 2 et le domaine CYS

Les souris KO pour le gène MUC2 sont dépourvues de mucus intestinal. Elles souffrent de colite sévère avec des diarrhées et la croissance de leur l'épithélium intestinal n'est plus contrôlée ce qui peut conduire au développement de tumeurs^{185,186}. Les modèles de colite induite par le Dextran-sulfate sodium (DSS) ont permis d'étudier le rôle du mucus et de MUC2 comme barrière physico-chimique. Les souris traitées par DSS font davantage de translocation intestinale avec des germes de la flore commensale tels que *Bacteroides thetaiotaomicron*¹⁸⁷. Les souris KO pour le gène de l'IL-10 présentent également une colite sévère et une absence de mucus intestinal. Ces données murines confirment le rôle central

que joue le mucus dans le dialogue avec le microbiote et le système immunitaire afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

La mucine MUC2 appartient aux mucines gélifiantes de l'intestin qui sont extrêmement bien conservées au cours de l'évolution des mammifères. Ce sont des protéines de haut poids moléculaire composé de trois parties distinctes.

Les régions carboxy et amino terminales sont composées de domaines dérivés du facteur de Von-Willebrandt avec une région riche en cystéines dans la partie carboxy terminale (CK domain). Les cystéines seraient impliquées dans des liaisons de type ponts disulfures, qui confèreraient à la protéine sa structure secondaire globulaire.

La partie centrale est riche en résidus sérine, thréonine et proline, nommées régions S/T/P. Ces domaines répétitifs sont entrecoupés par des domaines CYS constitués de 110 acides aminés dont 10 résidus cystéine qui sont conservés chez les vertébrés supérieurs (Figure 11). Ce domaine est présent en plusieurs copies dans les mucines : 2 dans MUC2, 7 dans MUC5B et 9 dans MUC5AC. Sa séquence est essentiellement composée d'acides aminés hydrophobes. Dans l'apomucine ceci se traduit par une alternance entre les domaines CYS hydrophobes et les régions S/T/P glycosylées hydrophiles. Dans l'environnement aqueux du mucus, des interactions hydrophobes réversibles entre les mucines (mucine::mucine) pourraient exister.

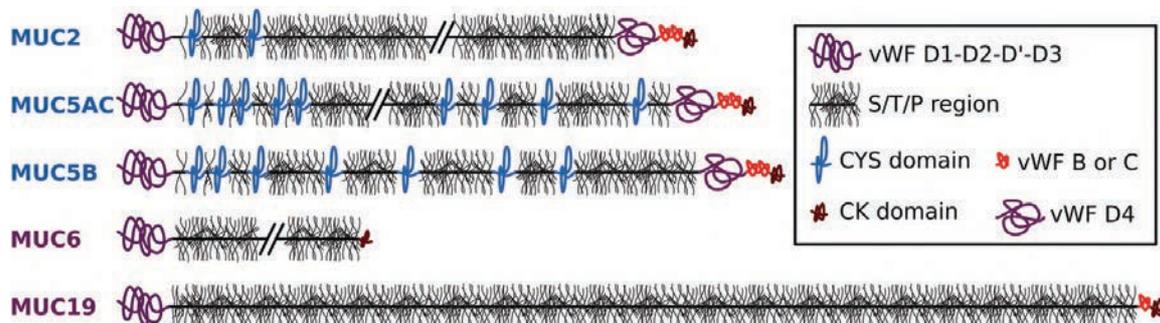


Figure 11. Les différentes mucines présentes chez l'homme. D'après Desmouveau et al.¹⁸⁸.

VIII. C. 2. La souris Tg222

Afin de mieux comprendre les fonctions du domaine CYS, une souris transgénique capable de libérer dans la lumière intestinale, une protéine recombinante composée de 12 domaines CYS consécutifs a été produite¹⁸⁹. La construction du transgène a été réalisée à partir d'un plasmide associant le promoteur Tff3 (Trefoil factor 3) à un exon codant pour 12 domaines CYS identiques issu de la protéine MUC5B et le gène de la GFP afin de suivre le transgène *in vivo* (Figure 12 & 13). Après purification, ce transgène a été intégré à une souris C57Bl/6 et la lignée transgénique maintenue de manière hétérozygote. Le contrôle de la présence du transgène peut être ensuite réalisé sur tissu par immunofluorescence et confirmé par génotypage des fragments d'ADN extraits à partir de l'extrémité de la queue.

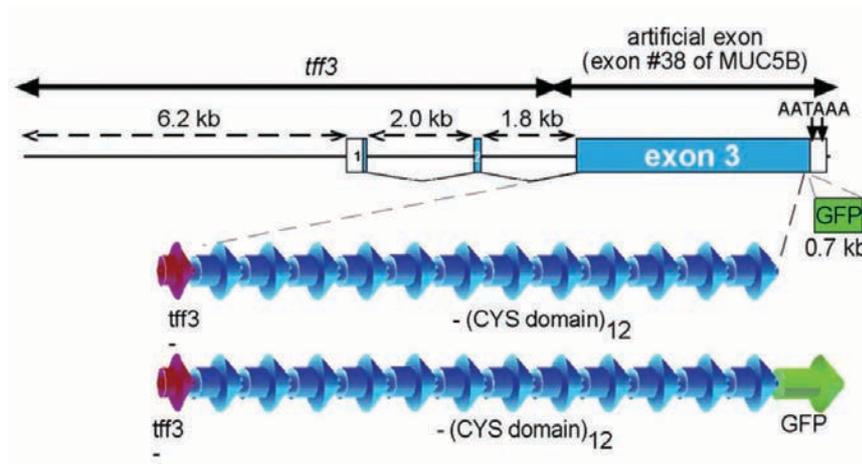


Figure 12. Synthèse et construction de la protéine recombinante comportant 12 domaines CYS. D'après Gouyer *et al.*¹⁸⁹.

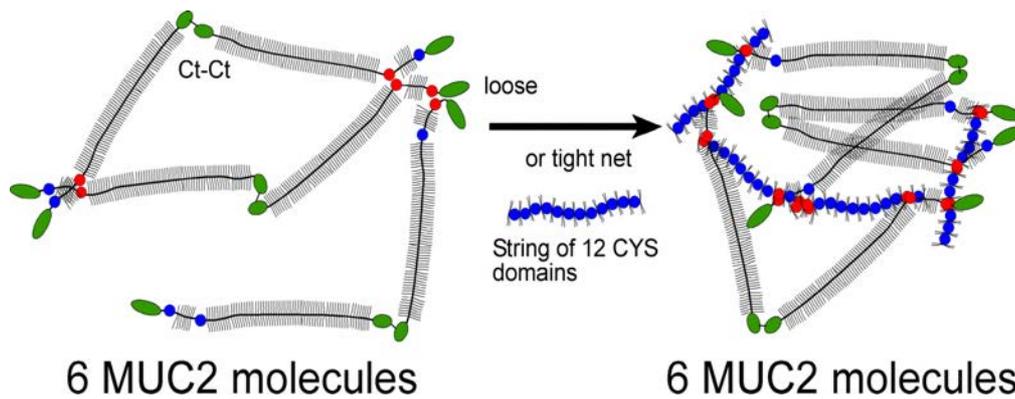


Figure 13. Modifications des interactions entre les différentes protéines MUC2 induites par le transgène composé de 12 domaines cystéines (en bleu). D'après Gouyer *et al.*¹⁸⁹.

Chez ces souris, l'observation par immunohistochimie de coupes transversales du tissu colique a révélé un mucus mieux conservé en comparaison à celui de souris de type sauvage (Figure 14). Le mucus des souris transgéniques est également plus résistant à la pénétration, comme en témoigne sa moindre perméabilité *in vitro*, à des billes carboxylées inertes. *In vivo*, ces souris sont plus résistantes à une colite chimiquement induite par DSS. De plus lorsque celles-ci sont gavées par une bactérie telle que *citrobacter rodentium* la clairance bactérienne ainsi que la protection contre la translocation intestinale sont meilleures. On note également chez ces souris une plus grande expression de glycannes sialylés et sulfatés, respectivement dans le côlon et l'iléon, avec dans l'iléon, une augmentation de la flore lactobacillaire. Il semblerait que les lactobacilles de part leur effet niche limitent la colonisation et la translocation d'éventuels pathogènes. Le domaine CYS joue donc un rôle important dans les propriétés fonctionnelles du mucus, comme la protection de la muqueuse contre la colonisation et la translocation des pathogènes. A ce jour aucune donnée n'est disponible sur l'atteinte de la barrière intestinale lors de la chimiothérapie d'induction et sur le potentiel rôle protecteur du domaine CYS.

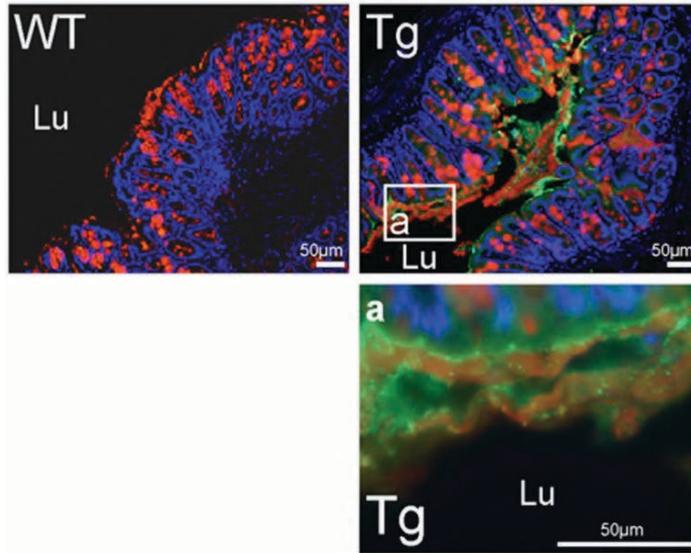


Figure 14. Visualisation du transgène au sein de la lumière intestinale du côlon des souris transgéniques Tg222 en immunohistochimie. D'après Gouyer *et al.*¹⁸⁹.

Objectifs de la thèse

Ce travail a pour objectif de mieux comprendre l'impact et les conséquences de la chimiothérapie d'induction sur la barrière intestinale des patients atteints de LAM devant bénéficier d'une allo-CSH, afin d'améliorer leur prise en charge. Il est structuré de la façon suivante :

- Etude de la barrière intestinale lors de l'administration d'une association de cytarabine et daunorubicine chez des patients atteints de LAM puis sur un modèle murin.

- Etude, dans ce contexte, du renforcement de l'effet de barrière chez une souris transgénique Tg222, sécrétant une protéine recombinante capable de renforcer le mucus intestinal.

- Etude de la réactivité des CPA (macrophages issus de monocytes circulants) et de la santé intestinale (*via* le taux de citrulline plasmatique) chez les patients devant recevoir une allo-CSH.

- Etude chez ces patients, du caractère prédictif de ces paramètres dans la survenue des complications post greffe, en particulier la GVH aiguë et la mortalité.

Articles originaux

I. Article 1 : Consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier and microbiota in acute myeloid leukemia: a translational study

I. A. Présentation et résultats de l'étude

Au cours de ce travail translationnel, nous avons étudié l'impact de la chimiothérapie d'induction sur la barrière intestinale chez l'homme atteint de LAM. Après avoir élaboré un modèle d'induction chez la souris sauvage, nous avons évalué l'intérêt d'un renforcement de la barrière intestinale chez une souris transgénique capable de sécréter dans la lumière intestinale une protéine enrichie en domaine CYS modifiant la viscosité du mucus.

Chez l'homme, il existait une atteinte transitoire de la masse entérocytaire fonctionnelle, se manifestant par une diminution significative de la citrulline en période d'aplasie pour se normaliser en sortie d'aplasie. L'étude des populations microbiennes à partir de selles montrait l'installation progressive d'une dysbiose, avec diminution des *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* au profit d'espèces aérotolérantes telles que *Enterococcus* spp, *E.coli* ou *Lactobacillus* spp qui persistaient après la sortie d'aplasie associée à une diminution de la diversité microbienne alpha et beta lors du séquençage.

Après administration d'un schéma d'induction de LAM à des souris sauvages, on observait une diminution de la citrulline plasmatique, associée à une atteinte de l'iléon distale caractérisée par une élévation du PCNA et du nombre de corps apoptotiques dans les 24 à 72h suivant la fin de l'induction. Ces paramètres se normalisaient 5 jours après la fin de la chimiothérapie. L'étude de la translocation bactérienne après challenge par une souche de *S. Typhimurium* a mis en évidence une translocation plus importante chez les souris chimiothérapées comparé aux souris sans chimiothérapie. Le renforcement de la barrière intestinale sur modèle murin sécrétant une protéine recombinante composée de 12 domaines CYS permettait une meilleure réparation de la barrière intestinale avec une

citrulline plus élevée, des dommages tissulaires moindres, une diminution de la translocation de *S. Typhimurium* 2 jours après la fin de la chimiothérapie et une préservation de l'alpha diversité.

Ce travail met en évidence une atteinte transitoire de l'épithélium intestinal avec l'installation d'une dysbiose plus prolongée, responsable de la colonisation puis de la translocation de pathogènes. Le renforcement de l'effet barrière comme preuve de concept permet une meilleure réparation tissulaire, et de limiter la translocation intestinale en préservant la diversité microbienne.

II. A. Article

**Consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier and microbiota in
acute myeloid leukemia: a translational study**

Running Title: Intestinal barrier, microbiota and chemotherapy

Thomas Hueso¹, Kenneth Ekpe², Camille Mayeur ², Anna Gatse¹, Marie Joncquel
Chevallier-Curt³, Guillaume Gricourt ^{4,5}, Christophe Rodriguez^{4,5}, Charles Burdet⁶,
Guillaume Ulmann⁷, Christel Neut¹, Salah-Eddine Amini¹, Patricia Lepage², Bruno
Raynard⁸, Christophe Willekens⁹, Jean-Baptiste Micol⁹, Stéphane De Botton⁹, Ibrahim
Yakoub-Agha^{1,10}, Jean-Luc Desseyn¹, Muriel Thomas², Paul-Louis Woerther ^{11,12*}, David
Seguy^{1,13*}

1- Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC UMR 995, Lille, France

2- Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

3- Department of Biochemistry, CHU Lille, Lille, France

4- NGS Platform, IMRB, CHU Henri Mondor, Créteil, France

5- INSERM U955, Créteil, France

6- EA3964 University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, School of Medicine, Paris,
France

7- Department of biochemistry, Hôpital Cochin – HUPC, APHP, Paris, France

8- Diet and Nutrition Unit, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

9- Hematology Unit, Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France

10- Hematology Unit, Allogeneic stem cell department, CHU Lille, Lille, France

11- Department of Microbiology and Infection Control, Henri-Mondor Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Créteil, France

12- EA 7380 Dynamyc, EnvA, UPEC, Paris-Est University, Créteil, France

13- Nutrition Unit, CHU Lille, Lille, France

* These authors share senior authorship

Corresponding author:

Prof David Seguy , MD, PhD

Nutrition Unit,

Claude Huriez Hospital,

1 place Verdun, CHU Lille, Lille France

Words : 4040

Figures : 7

Tables : 2

Abstract :

Induction chemotherapy (3+7 regimen) remains the gold standard for patients with acute myeloid leukemia (AML), but is responsible for gut damage leading to complications such as septicemia. We aimed to investigate the impact of induction chemotherapy on the intestinal barrier in patients with AML and in wild-type mice. Next, we assessed the potential benefit of strengthening the mucosal barrier in transgenic mice releasing a reinforced mucus layer (Tg222). In patients, we observed a decrease of plasma citrulline, a marker of the functional enterocyte mass, short chain fatty acids and fecal bacterial load, except for *Escherichia (E). coli* and *Enterococcus* spp., which became dominant. Both the α and β -diversities of fecal microbiota decreased. Plasma citrulline levels decreased in wild-type mice under chemotherapy with a higher load of *E. coli* and *Enterococcus* spp, and a concomitant histologic impairment. In Tg222 mice, citrulline levels were higher, the epithelium repaired faster, and α -diversity was preserved with a limited bacterial translocation compared with wild-type mice three days after completing chemotherapy. Our results highlight the intestinal damage and the dysbiosis induced by the 3+7 regimen. Our transgenic model, suggests that strengthening the intestinal barrier is a promising approach to limit septicemia.

Introduction

Induction chemotherapy that combines three days of anthracycline and seven days of cytarabine (3+7 regimen) remains the current standard of care for patients with acute myeloid leukemia (AML). It allows these patients to achieve remission in 70 to 80% of cases (1). Subsequently, most patients undergo consolidation and conditioning chemotherapy preceding allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) to achieve a definitive remission. During these treatments, several complications may mitigate the prognosis of AML, such as blood stream infections (BSI), relapse of the hematological disease, or acute graft-versus-host disease (GvHD) following allo-SCT. Indeed, due to their cytotoxicity, chemotherapies are responsible for the intestinal barrier failure that promotes BSI involving gram-negative rods from the digestive tract (2)(3). Furthermore, the widespread use of antibiotics enhances the dissemination of multidrug resistant bacteria, raising the health costs and finally increasing the infectious-related mortality rate (4). Nevertheless, the precise impact of both chemotherapies and broad-spectrum antibiotics on intestinal barrier integrity remains poorly understood.

The intestinal barrier is composed of three different components: the microbiota, the mucus layer, and the epithelial liner. Mucus interfaces the microbiota and mucosa allowing reciprocal and dynamic interactions that maintain gut homeostasis and act as physical, biochemical, and biological defenses against aggressions and infections (5)(6)(7). Mucus is essentially composed of water (>90%) and MUC2 gel-forming mucin (GFM) (8). The highly conserved mucin CYS domain acts as a natural crosslinker of MUC2 polymers that reinforces the mucus layer and mainly provides resistance against pathogen colonization (9)(10).

The aim of this translational study was to describe the intestinal barrier, including the microbiota, mucus, and epithelium in both AML patients and preclinical mouse models. The composition of microbiota has been previously assessed before, during and after a 3+7 regimen in AML patients. Because intestinal biopsies cannot be usually performed in

such patients, we assessed gut impairment by measuring the plasma concentrations of citrulline, a marker of functional enterocyte mass and the short-chain fatty acids (SCFA) in feces which are essential for maintaining colonic trophicity (11)(12)(13). To determine the role of chemotherapy on intestinal impairment in detail, we studied a murine model mimicking induction chemotherapy of AML without antibiotics. Finally, we challenged a transgenic mouse strain with a reinforced mucus layer to investigate the potential impact of strengthening the mucosal barrier during induction chemotherapy.

Material and Methods

Human

Enrollment

This monocentric prospective observational study was conducted in the hematological ward of Gustave-Roussy Hospital between April 2013 and January 2014. Fifteen consecutive patients with AML received a conventional 7+3 regimen combining high dose aracytine (cytarabine 200 mg/m²) for seven days and anthracycline (idarubicin 12 mg/m² or daunorubicin 60 mg/m²) for three days. Serum and feces were before induction (T0), during aplasia (T1) and after recovery phase (T2) were stored at -20°C and -80°C, respectively. Antibiotics were administered in case of fever, at the discretion of the clinician. At T0, T1, and T2, clinical parameters (temperature, antibiotic intake, febrile episodes, and body mass index), biological parameters (disease status, aplasia, bacteriological documentation, and multidrug-resistant bacterial carriage), fecal analyses were recorded. Our institutional ethics committee approved the study and all patients signed a nonopposition form for the use of their data for the purpose of the study.

Fermentative activity

Concentrations of SCFA (acetate, propionate, butyrate, valerate, caproate, isocaproate, and isovalerate) in the feces were analyzed using gas-liquid chromatograph (Nelson 1020; Perkin-Elmer, St. Quentin en Yvelines, France) after water extraction of acidified samples, as described previously (14).

Mice

Induction chemotherapy model

Eight-to-10 weeks old female B6D2F1 wild-type (Wt) mice were used. Increased doses of aracytine (Accord Healthcare, France) and doxorubicin (Arrowlabs, India) were administered intraperitoneally for five and three consecutive days, respectively, as previously described.(15)(16) Increased doses from 50 to 150 mg/kg/d of aracytine and 1 to 3 mg/kg/d of doxorubicin were myelosuppressive and well tolerated. Doses over 150 mg/kg/d and 3 mg/kg/d, respectively, were deleterious with high rate mortality. Thus, we elected a regimen based on aracytine 150 mg/kg/d and doxorubicin 3 mg/kg/d. Mice were kept in the specific pathogen-free animal facility of the University of Lille. Housing conditions fulfilled the European guidelines for animal welfare. Weight and tolerance were evaluated each day until the sacrifice at one (d+1), three (d+3) and five (d+5) days after the end of chemotherapy. Animal Care Committee of the region Nord–Pas de Calais approved all of the experimental protocols (APAFIS#8328-201622316064271v3).

Reinforced mucus layer model

We used transgenic mice (Tg222) releasing a recombinant molecule of 12 consecutive CYS domains (rCYSx12) GFP-tagged in their intestinal lumen. The generation of transgene and Tg222 mice has been described previously. In brief, a Tg plasmid containing the trefoil factor 3 (Tff3) promoter and an artificial exon encoding 12 CYS

sequences was created. Then the linearized DNA fragment was purified and injected into 4-week-old mice of a C57BL/6 genetic background. The Tg222 mice carry a reinforced mucus layer housing a greater abundance of *Lactobacillus* spp.

These modifications are associated with a reduced susceptibility to chemical induced colitis and a reduced bacterial translocation after oral gavage of *Citrobacter rodentium*. Heterozygous transgenic female with a C57BL/6 genetic background were bred with DBA/2 Wt male mice, and pairs of female Tg and Wt B6D2F1 mice from the same litter were used throughout the present study. Four-week-old mice were screened for the presence of the transgene by PCR analysis using tail DNA extracted using specific primers as previously described (10). The amplified products were subjected to electrophoresis on a 12% acrylamide/bis-acrylamide gel. The presence of the transgene was confirmed by epifluorescence microscopy of fresh ileum or colon and by PCR.

Blood analyses

Blood was collected by cardiac puncture. White cell, red cell and platelet counts were performed on hematological counter (BC-2800Vet, Mindray, Shenzhen, China).

Histology and immunochemistry

On the day of sacrifice, 5- μ m-thick sections of terminal ileum were prepared. Alternate sections were stained with *Alcian blue (AB)-periodic acid-Schiff (PAS)* and hematoxylin and eosin (HE). Villus height and crypt depth were determined on 10 villi in three different sections. To count goblet cells, the total number of PAS-positive cells was determined in 10 longitudinally sectioned crypts of villi of the ileum per section. The number of goblet cells was expressed as the total number of PAS-positive cells per villus. Intestinal damage was assessed using a validated score of colitis, taking into account the extent of

inflammatory cell infiltrates, epithelial changes with goblet cell loss and mucosal architecture with villous blunting (17). Sections were stained immunohistochemically with anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using the PC10 anti-PCNA monoclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK), as described previously (10). To assess apoptosis, we used a TDT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method (Roche, Boulogne-Billancourt, France). When using the ab290 antibodies and TUNEL, a heat-mediated antigen retrieval step was performed before conducting the immunohistology (18).

Bacterial culture

Tissues (ileum, spleen, and liver) were harvested and introduced into preweighed vials containing 1.5 mL of cysteinated Ringer's solution to assess intestinal translocation. After physical disruption, dilutions were assessed and cultivable microbiota from feces and tissues were quantified.(18) Total counts were conducted and different types of colonies were subcultured and identified according to established morphological and biochemical criteria. Final identification was confirmed by mass spectrometry (MALDI-TOFF, Biotyper instrument, Bruker Daltonics).

Salmonella Typhimurium challenge

To evaluate the potential impact of mucus reinforcement, we studied intestinal translocation of *Salmonella Typhimurium* administered by oral gavage the last day of induction chemotherapy. Thus, mice were infected with 100 μ L of an overnight culture of Luria broth (LB) containing approximately 10^7 CFU of the kanamycin-resistant GFP-tagged *S. enterica* serovar Typhimurium strain and killed two days postinfection corresponding to d+2. Feces and biopsy specimens of ileum, spleen and liver were collected in a preweighed 2.0 mL microtube containing 1.0 mL of PBS. Tissue and feces were weighted and then homogenized with a pellet pestle. Tissues and feces were serially diluted in

phosphate buffer saline (PBS), plated onto LB agar plates containing 100 mg/mL of kanamycin sulfate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) and incubated overnight at 37°C(19)(20). *S. Typhimurium* colonies were counted the following day and normalized to tissue weight.

Human and mouse

Plasma citrulline level

Fasting plasma from human and mouse were deproteinized with a sulfosalicylic acid solution and the supernatants were stored at - 80°C until analysis. Citrulline concentrations were assessed by high-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry as previously described (21).

DNA extraction and qPCR of flora in human feces and in mouse terminal ileum

Total DNA was extracted from aliquots of 200–250 mg of human feces and mouse terminal ileum as described previously.(22) The total load of aerotolerant (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Colibacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) and anaerobic bacteria (*Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Akkermansia*) present in the samples at each time was evaluated using quantitative PCR (qPCR) analyses, as previously described.(23) PCR inhibition was tested with fecal DNA dilutions using a TaqMan exogenous internal positive control (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). No inhibition was detected using 10⁻³ dilutions of fecal DNA; consequently, this dilution was used for all PCR amplifications.

Microbiota characterization in human feces and in mouse terminal ileum

Bacterial diversity was assessed for each sample by targeting the V3 and V4 hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA-coding gene ('16SFor' 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3' and '16SRev' 5'-CTACCNGGGTATCTAAT-3'). Amplification was assessed using an optimized and standardized 16S-amplicon-library preparation protocol (Metabiote; GenoScreen, Lille, France).

Briefly, 16S rRNA gene PCR was conducted using 5 ng of genomic DNA according to Metabiote protocole instructions using 192 bar-coded primers (Metabiote MiSeq Primers; GenoScreen) at final concentrations of 0.2 μ M and an annealing temperature of 50°C for 30 cycles. PCR products were cleaned up using an Agencourt AMPure XP-PCR Purification system (Beckman Coulter, Brea, USA), quantified according to the manufacturer's protocol, and multiplexed at equal concentration. Sequencing was performed using a 300-bp paired-end sequencing protocol on an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA) at GenoScreen.

Bioinformatic analyses

Genoscreen performed the quality preprocessing and merging of sequences. The next steps were realized with Snakemake to manage QIIME (2019.1) software (24)(25).

Operational Taxonomic Units (OTUs) were created with a dedicated protocol for the 16S Illumina protocol, using a specific quality criterion, with Deblur software (26). Blast+ and SILVA database (release 128, version 99) were used to annotate sequences (27)(28). Then, Mafft aligned sequences and phylogenetic trees were built with FastTree to calculated diversity metrics (29) (30).

Microbiome diversity was analyzed using alpha and beta-diversity metrics. Alpha-diversity, which refers to diversity within samples, was studied using Shannon and Chao-1

indices. Beta-diversity was estimated using unweighted and weighted Unifrac distances (31)(32). Diversity analysis was assessed with 10360 and 9000 sequences for the human and the murine studies, respectively. A PERMANOVA test was used to compare beta-diversity between groups. Principal coordinate analysis (PCoA) of unweighted Unifrac distances was conducted with Emperor to study the evolution of beta-diversity over time (33).

Statistical analyses

Continuous variables were presented as median and range or interquartiles range. For the human study, the non-parametric Friedman test was used to realize multiple comparisons. Comparisons for each patient between T0 and T1, and T0 and T2 were conducted using the Wilcoxon signed-rank test. One patient who died between T0 and T1 was excluded from the analysis.

For mouse experiments, the Kruskal-Wallis test was used to conduct multiple comparisons. The Mann-Whitney test was used to compare baseline data with data at various times or of control mice with chemotherapy groups. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare Wt and Tg mice from the same litter. Overall survival was estimated using a log-rank test and represented by Kaplan-Meier curves.

Statistical significance was defined as $p < 0.05$ based on two-sided tests. Statistical analyses were performed using R, version 3.1.0 (R Foundation for Statistical Computing) and GraphPad Prism, version 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Human

Initial characteristics of the 15 patients enrolled are detailed in Table 1. All patients had a neutropenic fever and received antibiotics targeting gram-negative bacteria after

receiving the 3+7 regimen. Septicemia diagnosed in 40% of patients (6/15) was mostly due to *E. coli* (4/15). One patient died due to a septic shock arising out of a refractory candidemia. There was a significant weight loss (expressed in percent of the weight at T0) at T1 (-2.6% [-5.7; 0.9]; $p = 0.027$) and T2 (-5.2 % [-7.9; -0.5]; $p = 0.006$). Compared with T0 (29 [22-33] $\mu\text{mol/L}$), plasma citrulline levels decreased significantly at T1 (14 [10-19] $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.0002$), and reached near normal values at T2 (25 [18-34] $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.412$), but it remained below 26 $\mu\text{mol/L}$ in 7/14 patients (Fig 1a). Over 70% of patients were in remission after induction chemotherapy.

Dysbiosis

The bacterial load of the feces assessed by qPCR decreased between T0 and T1 (-0.8 log bact/g; $p = 0.004$) and remained low at T2 (-1 log bacteria/g; $p = 0.05$). The decrease observed from T0 to T1 affected the following groups: *Bacteroides* spp., *Akkermansia*, *Streptococcus* spp., *Clostridium (C.) coccoides*, *C. leptum* and *Bifidobacterium* spp. (Fig 1b). Except for *Bifidobacterium* spp., which decreased, the bacterial load was not different between T1 and T2. The load of *Enterococcus* spp., *Escherichia (E.) coli* and *Lactobacillus* spp. remained unchanged throughout the follow-up (Fig 1b).

In NGS analyses, alpha-diversity assessed by the Shannon index decreased between T0 (3.6 [2.45-4.5]) and both T1 (2.05 [1.14 -3.35]) ($p = 0.008$) and T2 (1.46 [0.55-3.02]) ($p = 0.003$), but not between T1 and T2. Similarly, the Chao-1 index decreased between T0 (160 [72-183]) and both T1 (62 [49-123]) ($p = 0.001$) and T2 (52 [23-70]) ($p = 0.002$), but not between T1 and T2 (Fig 2a). Regarding beta-diversity, the unweighted and weighted Unifrac decreased significantly between T0 and both T1 ($p = 0.02$ and $p = 0.001$) and T2 ($p = 0.001$ and $p = 0.001$), but not between T1 and T2 ($p = 0.25$ and $p = 0.76$), respectively.

Analysis of the heatmap presented in Fig. 2b resulted in the identification of two major groups of microbiota patterns. The first group was mostly composed of T0 samples characterized by the domination of commensal *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Ruminococcaceae*. A mix of T0, T1, and T2 samples, roughly dominated by *Enterobacteriaceae* also belonged to this group. The second group was exclusively composed of both T1 and T2 samples and it was characterized by the broad domination of *Enterococcaceae*. These patterns corresponded with the quantitative stability of *E. coli* and *Enterococcus* observed with qPCR. In two samples where *Enterococcaceae* were less abundant, the composition was dominated by *Pseudomonadaceae*.

Unweighted Unifrac principal component analysis showed the clustering of the three groups of samples (T0, T1 and T2) according to their composition (Fig. S1).

SCFA released

Compared with T0, we observed a significant decrease of SCFA concentrations at T1 and T2. At T2, it concerned all SCFA (Table 2).

Mice

Outcome of induction chemotherapy model

As observed in patients after the completion of the induction chemotherapy, the mortality was low with the elected regimen, and mice experienced a transient decrease in both blood count and body mass, which normalized within 1 week and 3 weeks, respectively, (Fig. 3a to 3f). Plasma citrulline concentration also decreased throughout the chemotherapy administration until d+3 and reached normal values at d+5 following its completion (Fig. 3g).

Compared with the baseline (0 [0-0]), histological damage score of the terminal ileum mucosa increased at d+1 (6 [5-7]) ($p = 0.006$) and remained high until d+3 (3 [3-5]) ($p = 0.002$), before reaching baseline values at d+5. The number of goblet cells followed the same kinetic variation. Similarly, compared with the baseline, the number of both PCNA positive (14 [14-15]) and apoptotic cells (0 [0-0]) rose at d+1 (20 [17-23] and 2 [1-3]) ($p = 0.04$ and $p = 0.006$), and d+3 (23 [20-27] and 2 [2-4]) ($p = 0.002$ and $p = 0.002$), respectively, and then decreased to reach normal values at d+5 (Fig. 4a to 4e).

We observed a similar bacterial load in the terminal ileum, spleen, and liver at baseline and d+3. Nevertheless, we identified exclusively *Lactobacillus* spp. at baseline, while aerotolerant species such as *E. coli* and/or *Enterococcus* spp., appeared at d+3 (Fig. S3).

Outcome of reinforced mucus layer model

Mouse weights remained comparable between Wt and Tg groups throughout the induction chemotherapy (fig. 5a and 5b). However, at baseline, plasma citrulline levels were higher in the Tg (76 [68-83] $\mu\text{mol/L}$) than in the Wt group (71 [63-78] $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.0017$). The levels reached a nadir averaging at d+1 in both groups but rose faster in Tg mice (44 [39-55] $\mu\text{mol/L}$ vs. 39 [31-42] $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.046$) at d+3 (Fig. 5c). In the latter's, the tracking of the GFP-tagged transgene by confocal microscopy, demonstrated a significant transient decrease of fluorescence at d+1 that reached progressively normal value at d+5 (fig. 5d and 5e).

After induction chemotherapy, the histological recovery was faster at d+3 in Tg compared with Wt mice: lower damage score (2 [1-2] vs. 3 [3-5]; $p = 0.0003$) with higher villi, a deeper crypt, and more goblets cells per villus and PCNA-positive cells per crypt. The increase of apoptotic cells, mainly localized in crypts, was similar in the two groups (Fig 6a and 6b).

Quantitative PCR analysis of adherent flora of the terminal ileum revealed similar concentration of overall bacteria and *Lactobacillus* spp. (*L. murinus*, *L. reuteri*, *L. gasser*) at baseline and d+3 in both Tg and Wt groups. Concentration of *C. leptum* was also comparable at baseline between the two groups (6.42 [5.93-6.56] log bacteria/g vs. 6.39 [5.96-6.88] log bacteria/g), but it was higher in Tg group at d+3 (6.44 [5.89-7.07] log bacteria/g vs. 5.41 [4.97-6.51] log bacteria/g; $p = 0.02$).

Results of alpha-diversity at d+3 are detailed in Fig. 6c. They were similar between Tg and Wt mice within the control group. Despite a trend of higher Shannon index (2.47 [1.9-2.8] vs. 1.38 [0.66-2.61]; $p = 0.07$), only the Chao-1 index was higher in Tg mice compared with Wt mice at d+3 (124 [86-137] vs. 88 [43-104]; $p = 0.05$). In addition, while the indexes were lower in Wt than in control mice (1.38 [0.66-2.61] vs. 2.74 [1.91-4.53]; $p = 0.04$ and 88 [43-104] vs. 128 [96-210]; $p = 0.01$, respectively), they remained stable in Tg mice. Regarding beta-diversity at d+3, both unweighted and weighted Unifrac measures were not different between Tg and Wt control mice ($p = 0.44$) and at d+3 after chemotherapy ($p = 0.84$). Compared with the control group, the unweighted Unifrac decreased significantly in chemotherapy groups for both Wt ($p = 0.011$) and Tg mice ($p = 0.043$). However, the weighted Unifrac decreased significantly only in Tg mice ($p = 0.031$) and did not reach statistical significance in Wt mice ($p = 0.15$). Unweighted Unifrac principal component analysis was illustrated in Fig. S2.

After the *S. Typhimurium* challenge, we observed a lower translocation in Tg compared with Wt mice in both the liver (1.55 [1.33-2.19] log CFU/g vs. 2.27 [1.51-3.59] log CFU/g; $p = 0.033$) and the spleen (2 [1.85-2.2] log CFU/g vs. 2.94 [1.94-5.18] log CFU/g; $p = 0.046$). In control mice, which received PBS instead of chemotherapy, we did not observe significant translocation due to *S. Typhimurium* (Fig. 7a and 7b).

Discussion

To understand how the association of induction chemotherapy and antibiotics affects the intestinal barrier and modifies the intestinal microbiota, we have prospectively monitored a cohort of patients with AML before, during, and after a 3+7 regimen. As expected, following chemotherapy administration, the patients lost weight, developed aplastic fever requiring broad-spectrum antibiotics and were susceptible to *E. coli* septicemia. During this period, we evidenced intestinal barrier impairment, as determined by plasma citrulline levels and feces SCFA collapse, and deep modifications of intestinal microbiota combining a dramatic loss of overall bacterial diversity with a switch from anaerobic to aerotolerant bacteria.

As already observed, the overall decrease of bacterial populations was mostly due to the loss of oxygen sensitive commensals such as *Clostridiales*, in favor of the relative abundance of *E. coli* and *Enterococci* (4)(34). The quantitative stability of these bacteria in qPCR is consistent with the qualitative clustering of the samples in different patterns, and the gradual relative enrichment of *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*, that are non-dominant species in enterotypes of healthy human, according to the time of sampling (35).

These modifications were concomitant with a decrease of plasma citrulline and feces SCFA levels, two surrogate markers, which reflect the functional enterocyte mass and the microbial fermentative activity, respectively. Citrulline is a nonproteic amino acid produced mainly by enterocytes from glutamine. It was initially monitored in patients with short bowel syndrome reflecting the reduction of functional enterocyte mass (36)(37). Then it was measured in patients with hematological malignancies to assess the intestinal impairment due to high dose chemotherapy regimen (38)(39). It is highly correlated with the intestinal permeability test and the incidence of bacteriemia in such patients (40)(41). SCFA are produced mainly by colonic bacteria especially anaerobic bacteria from the fermentation of indigestible polysaccharides.(42) The SCFA have a trophic effect on

colonocytes, regulating their crypt depth, mucus secretion and limiting the bacterial luminal expansion of bacteria (43). They also play a role in tissue homeostasis and their decrease limits intestinal repair (especially during graft versus host disease, GvHD) and colonic regulatory T-cell expansion (44)(45).

To highlight the specific role of induction chemotherapy on intestinal barrier, we mimicked AML induction in mouse model without antibiotic administration. Our model was fairly representative of the 3+7 regimen in humans: features included transient weight loss, decrease of all whole blood counts, and loss of enterocyte functional mass depicted by a decrease of citrulline levels and observed by histological impairment of the terminal ileum. Otherwise that observed in human study, in absence of antibiotic pressure, the changes in intestinal microbiota consecutive to chemotherapy were mainly qualitative in the Wt model (46). Indeed, qPCR analyses did not reveal the loss of most bacterial populations, but compared with the baseline, *E. Coli* and *Enterococcus* spp. colonized the terminal ileum and translocated through the damaged intestinal epithelium.

At the baseline, the mucosal barrier strengthening of Tg mice was suggested by higher plasma citrulline levels than those in Wt mice. While intestinal damage induced by chemotherapy was initially similar in both Tg and Wt mice. Tg mice had a faster ileum repair three days after chemotherapy achievement, with lower tissue damage score, higher PCNA staining and citrulline levels. The ileum flora of Tg mice was maintained while alpha-diversity albeit to a lesser extent than for beta-diversity decreased after chemotherapy in Wt mice. Moreover, Tg mice appeared less sensitive to the *S. Typhimurium* translocation. Thus, we hypothesized that BSI proceeded in two steps: first chemotherapy induced dysbiosis and an increase in the burden of aerotolerant bacteria and, subsequently, the translocation of bacteria through the damaged intestinal barrier (47). Although the baseline colonizations were similar in Wt and Tg mice, our results show that mucus reinforcement could limit diversity impairment and pathological bacterial translocation after induction chemotherapy.

For decades, improving the intestinal barrier has remained a challenge in patients experiencing chemotherapy. Various products have been tested in murine models to maintain intestinal homeostasis during allo-SCT procedure, such as keratinocyte growth factor or analog of R-Spondin that inhibits heat shock proteins (48)(49)(50). In the last decade, our team demonstrated the beneficial role of early enteral nutrition, presumably due to its intestinal trophic effect on both GvHD severity and mortality in patients undergoing allo-SCT (51)(52)(53)(54). More recently, we reported that increased macrophage reactivity and lower plasma citrulline concentration before allo-SCT were strongly correlated with the incidence of GvHD in humans. These two parameters reflect persistent subclinical damage secondary to high dose chemotherapies delivered during a 3+7 regimen (55). In addition, the interest of plasma citrulline level as a strong predictive factor of GvHD before an allo-SCT procedure was recently confirmed (12)(56). More specifically, in our experience, when citrulline level is below 26 $\mu\text{mol/L}$ before an allo-SCT, which occurred in half of the patients in the present study, it constitutes an independent risk factor associated with stage 2–4 gastrointestinal GvHD after the transplantation (12). Altogether, these data support the concept that maintaining intestinal integrity in patients receiving an AML induction regimen and further chemotherapies could prevent bacterial translocation responsible for innate immune response and, thus, GvHD after allo-SCT.

To our knowledge, our translational study is the first showing the deep modification of the entire intestinal barrier and physiopathology of BSI during the 3+7 regimen. We revealed in the human study that the association of both chemotherapy and antibiotics altered intestinal barrier deeply with a loss of microbial diversity and metabolites and a physical impairment of epithelium. Our murine model highlighted more precisely the specific impact of chemotherapy characterized by a qualitative dysbiosis and physical barrier impairment that enhance bacterial translocation. As a proof of concept, strengthening the mucus may improve intestinal repair, and maintain microbiota diversity limiting colonization and translocation of entero-invasive bacteria (57). These results should

lead to the development of new approaches to limit BSI and improve the outcome of patients with AML.

Acknowledgements

Authors acknowledge J. Devassine (Animal Core Facility, Univ Lille), and M-H. Gevaert (Univ Lille) for the slides, M. Tardivel and A. Bongiovanni (Imaging Core Facility Univ Lille), S. Plet, M. Magnien, M. Djouina and F. Magiotto (LIRIC UMR U995) for technical support. We also thank the University Hospital of Lille for financial support with the “Projet émergence”.

Competing Interests

The authors have no competing interest to disclose

References

1. Lee J-H, Kim H, Joo Y-D, et al. Prospective Randomized Comparison of Idarubicin and High-Dose Daunorubicin in Induction Chemotherapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(24):2754-2763.
2. Kolonen A, Sinisalo M, Huttunen R, et al. Bloodstream infections in acute myeloid leukemia patients treated according to the Finnish Leukemia Group AML-2003 protocol – a prospective nationwide study. *Infect Dis (Auckl)*. 2017;49(11-12):799-808.
3. Conn JR, Catchpoole EM, Runnegar N, Mapp SJ, Markey KA. Low rates of antibiotic resistance and infectious mortality in a cohort of high-risk hematology patients: A single center, retrospective analysis of blood stream infection. *PLoS One*. 2017;12(5):1-13.
4. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4332-4341.
5. Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, et al. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol*. 2013;11:61.
6. Schroeder BO. Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Rep*. 2019;7(1):3-12.
7. Allain T, Amat CB, Motta JP, Manko A, Buret AG. Interactions of Giardia sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*. 2017;5(1):1-16.

8. Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One*. 2011;6(4):13-16.
9. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):352-361.
10. Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, et al. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep*. 2015;5:9577.
11. van Vliet MJ, Tissing WJ, Rings EHM, et al. Citrulline as a Marker for Chemotherapy Induced Mucosal Barrier Injury in Pediatric Patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:1188-1194.
12. Hueso T, Gauthier J, Joncquel Chevalier-Curt M, et al. Association Between Low Plasma Level of Citrulline Before Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Severe Gastrointestinal Graft vs Host Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(6):908-917.
13. Suzuki T, Yoshida S, Hara H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability. *Br J Nutr*. 2008;100(2):297-305.
14. Lan A, Bruneau A, Bensaada M, et al. Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Br J Nutr*. 2008;100(6):1251-1259.
15. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev*. 2009;23(7):877-889.
16. Wunderlich M, Mizukawa B, Chou F, et al. AML cells are differentially sensitive to

- chemotherapy treatment in a human xenograft model. *Blood*. 2013;121(12):90-97.
17. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):4557-4576.
 18. De Chambrun GP, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, et al. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol*. 2014;7(3):589-601.
 19. Barthel M, Hapfelmeier S, Kremer M, et al. Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect Immun*. 2003;71(5):2839-2858.
 20. Martz S-LE, McDonald JAK, Sun J, et al. Administration of defined microbiota is protective in a murine Salmonella infection model. *Sci Rep*. 2015;5:16094.
 21. Filee R, Schoos R, Boemer F. Evaluation of Physiological Amino Acids Profiling by Tandem Mass Spectrometry. Zschocke J, Gibson KM, Brown G, Morava E, Peters V, eds. *JIMD Rep*. 2014;13:119-128.
 22. Godon J-J, Emmanuelle Z, Patrick D, Frédéric H, René M. Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Smal-Subunit rDNA Sequence Analysis. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(7):2802-2813.
 23. Mayeur C, Gratadoux JJ, Bridonneau C, et al. Faecal D/L Lactate Ratio Is a Metabolic Signature of Microbiota Imbalance in Patients with Short Bowel Syndrome. *PLoS One*. 2013;8(1):e54335.
 24. Köster J, Rahmann S. Snakemake-a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2520-2522.
 25. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7(5):335-336.

26. Amir A, Mcdonald D, Navas-Molina JA, et al. Correcting for Microbial Blooms in Fecal Samples during Room-Temperature Shipping. *mSystems*. 2017;2(2). e00199-16
27. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST + : architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;9(12):1-9.
28. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:590-596.
29. Katoh K, Standley DM. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7 : Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-780.
30. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One*. 2010;5(3):e9490.
31. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8228-8235.
32. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and Qualitative Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576-1585.
33. Vasquez-Baeza Y, Gonzalez A, Smarr L, Mcdonald D, Morton JT. Forum Bringing the Dynamic Microbiome to Life with Animations. *Cell Host Microbe*. 2017;21(1):7-10.
34. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016;8(339):339ra71-339ra71.
35. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome.

- Nature*. 2011;473(7346):174-180.
36. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr*. 2008;27(3):328-339.
 37. Crenn P, Coudray Lucas C, Thuiller F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive Plasma Citrulline Concentrations Is a Marker of Absorptive Enterocyte Mass and Intestinal Failure in Humans. *Gastroenterology*. 2000;119:1446-1505.
 38. van der Velden WJFM, Herbers AHE, Feuth T, Schaap NPM, Peter Donnelly J, Blijlevens NMA. Intestinal damage determines the inflammatory response and early complications in patients receiving conditioning for a stem cell transplantation. *PLoS One*. 2010;5(12):e15156.
 39. Herbers AH, Feuth T, Donnelly JP, Blijlevens NM. Citrulline-based assessment score: First choice for measuring and monitoring intestinal failure after high-dose chemotherapy. *Ann Oncol*. 2010;21(8):1706-1711.
 40. Lutgens LCHW, Blijlevens NMA, Deutz NEP, Donnelly JP, Lambin P, de Pauw BE. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: A comparison with sugar permeability tests. *Cancer*. 2005;103(1):191-199.
 41. Herbers AHE, Blijlevens NMA, Donnelly JP, de Witte TJM. Bacteraemia coincides with low citrulline concentrations after high-dose melphalan in autologous HSCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(5):345-349.
 42. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*. 2003;62(1):67-72.
 43. Rivera-Chávez F, Zhang LF, Faber F, et al. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):443-454.

44. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450.
45. Mathewson ND, Jenq R, Mathew A V, et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol*. 2016;17(5):505-513.
46. Montassier E, Gastinne T, Vangay P, et al. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42(5):515-528.
47. Montassier E, Al-Ghalith GA, Ward T, et al. Pretreatment gut microbiome predicts chemotherapy-related bloodstream infection. *Genome Med*. 2016;8(1):49.
48. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for Oral Mucositis after Intensive Therapy for Hematologic Cancers. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2590-2598.
49. Levine JE, Blazar BR, DeFor T, Ferrara JLM, Weisdorf DJ. Long-term follow-up of a phase I/II randomized, placebo-controlled trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after related donor allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(9):1017-1021.
50. Joly A-L, Deepti A, Seignez A, et al. The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft versus host disease development. *Oncogene*. 2015;35(April):1-10.
51. Seguy D, Berthon C, Micol J-B, et al. Enteral feeding and early outcomes of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation following myeloablative conditioning. *Transplantation*. 2006;82(6):835-839.
52. Azarnoush S, Bruno B, Beghin L, et al. Enteral nutrition: a first option for nutritional support of children following allo-SCT? *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(9):1191-

1195.

53. Seguy D, Duhamel A, Rejeb M Ben, et al. Better outcome of patients undergoing enteral tube feeding after myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2012;94(3):287-294.
54. Gonzales F, Bruno B, Alarcón Fuentes M, et al. Better early outcome with enteral rather than parenteral nutrition in children undergoing MAC allo-SCT. *Clin Nutr*. 2018;37(6):2113-2121.
55. Hueso T, Coiteux V, Joncquel Chevalier Curt M, et al. Citrulline and Monocyte-Derived Macrophage Reactivity before Conditioning Predict Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(6).
56. Rashidi A, Shanley R, Holtan SG, et al. Pretransplant Serum Citrulline Predicts Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(11):2190-2196.
57. Desseyn J-L, Gouyer V, Gottrand F. Biological modeling of mucus to modulate mucus barriers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;(30):G225-G227.

Tables and figures

Patient characteristics	
Age, median [range]	54 [35-74]
Sex, n (%)	
Female	6 (40)
Male	9 (60)
AML, n (%)	
De novo	12 (80)
Secondary	3 (20)
BMI at admission, median [range]	25.3 [17.3-31]
Induction chemotherapy, n (%)	
Ida + Arac*	7 (47)
Dauno + Arac [‡]	8 (53)
Time of assessment[¶], median [range]	
T0	-2 [-12-0]
T1	12 [8-18]
T2	24 [18-35]
ATB before induction phase, n (%)	11 (73)
ATB during induction phase, n (%)	15 (100)
Tazocilline	10 (67)
Imipenem	9 (60)
Cefepime	5 (33)
Vancomycine	3 (20)
During of ATB administration, day [range]	28 [15-43]
During of neutropenia, day [range]	20 [9-35]
Neutropenic fever, n (%)	15 (100)
Documented Septicemia, n (%)	7 (47)
<i>Escherichia coli</i>	4 (26)
<i>Enterococcus spp</i>	1 (7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (7)
<i>Clostridium perfringens</i>	1 (7)
Remission after induction, n (%)	11 (73)

Table 1. Patient characteristics

*Idarubicin 12 mg/m² from d1 to d3 and aracytine 200 mg/m² from d1 to d7. †Daunorubicine 60 mg/m². ‡Time of assessment considering the delay from the initiation of chemotherapy: T0: before induction, T1: during aplastic period, and T2: after hematological recovery phase. Septicemia was documented with blood culture. AML: acute myeloid leukemia; Ida: idarubicin; AraC: aracytine; Dauno: Daunorubicine; BMI: body mass index; ATB: antibiotics.

Fermentative activity ($\mu\text{mol/g}$)	T0	T1	T2	<i>p</i>*	<i>p</i>**
Acetate	11.5 [4.8-21.8]	2.6 [1.8-9.9]	3.4 [2.3-11.4]	0.02	0.04
Propionate	4.7 [1.3-7.2]	0.3 [0.1-0.9]	0.1 [0.1-0.7]	0.08	0.03
Butyrate	1.9 [0.2-3.4]	0.1 [0-1.5]	0 [0-0.3]	0.2	0.03
Valerate	0.2 [0.1-1.1]	0 [0-0.2]	0 [0-0]	0.04	0.004
Caproate	0	0	0	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Isocaproate	0.4 [0.1-0.8]	0 [0-0.6]	0 [0-0.2]	0.1	0.05
Isovalerate	0.4 [0.2-0.9]	0 [0-0.5]	0 [0-0.2]	0.09	0.05

Table 2. Comparison of fermentative activity in feces.

Results are expressed as median and interquartile range. The Wilcoxon signed-rank test was used to compare T0 vs. T1* and T0 vs. T2**, $p < 0.05$ is considered significant, *n.s.*: not significant.

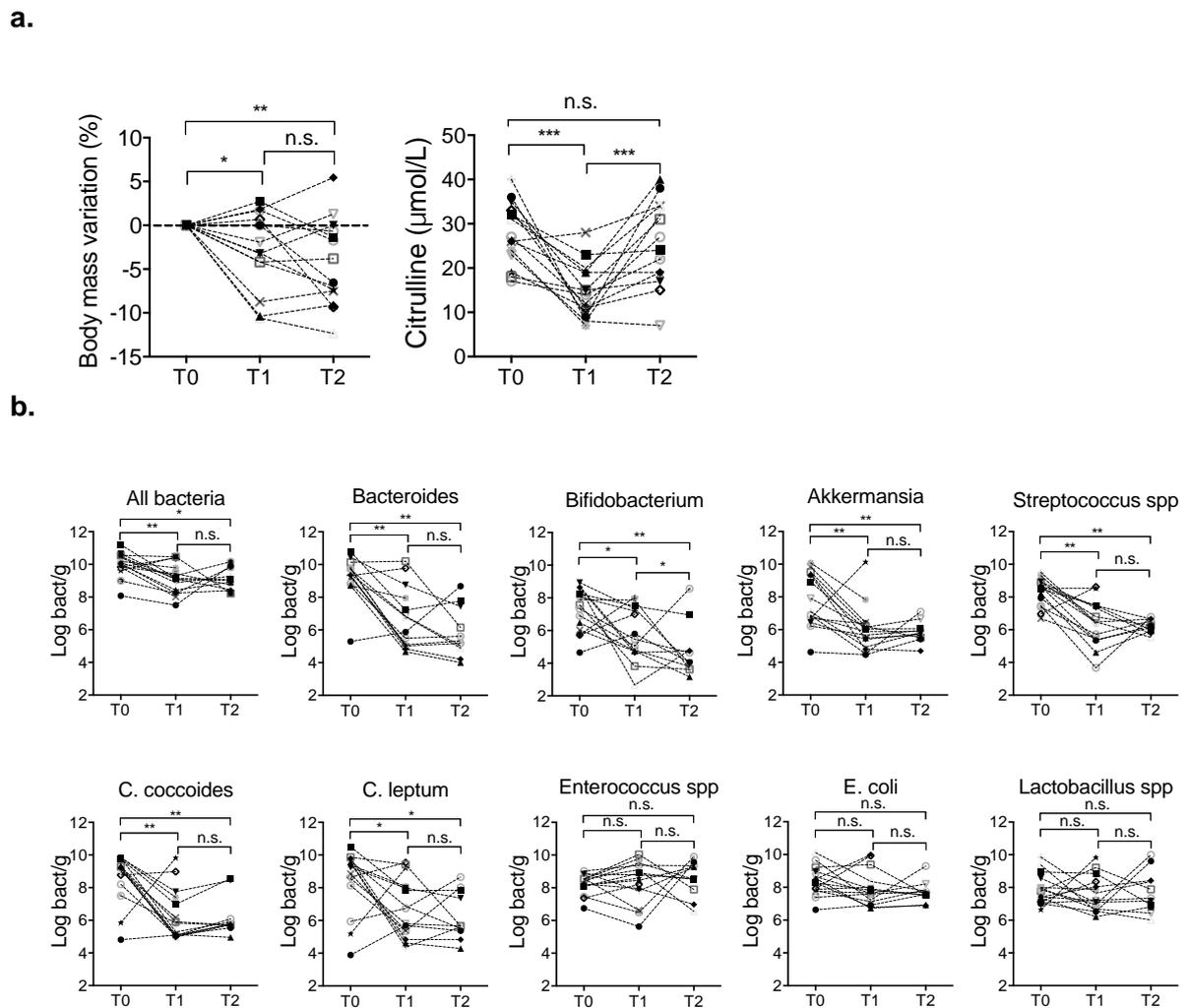


Figure 1.

a. Body mass variation and plasma citrulline level in patients before induction (T0), during aplasia (T1) and after hematological recovery (T2). **b.** Quantitative PCR for aerotolerant and anaerobic bacteria in patients' feces. *C.* *Clostridium*; *E.* *Escherichia*. The Friedman test for multiple comparisons (T0, T1, T2) and Wilcoxon signed-rank test were used to compare T0 vs. T1 (n=15) and T1 vs. T2 (n=14). $p < 0.05$ is considered significant, n.s.: not significant. * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 .

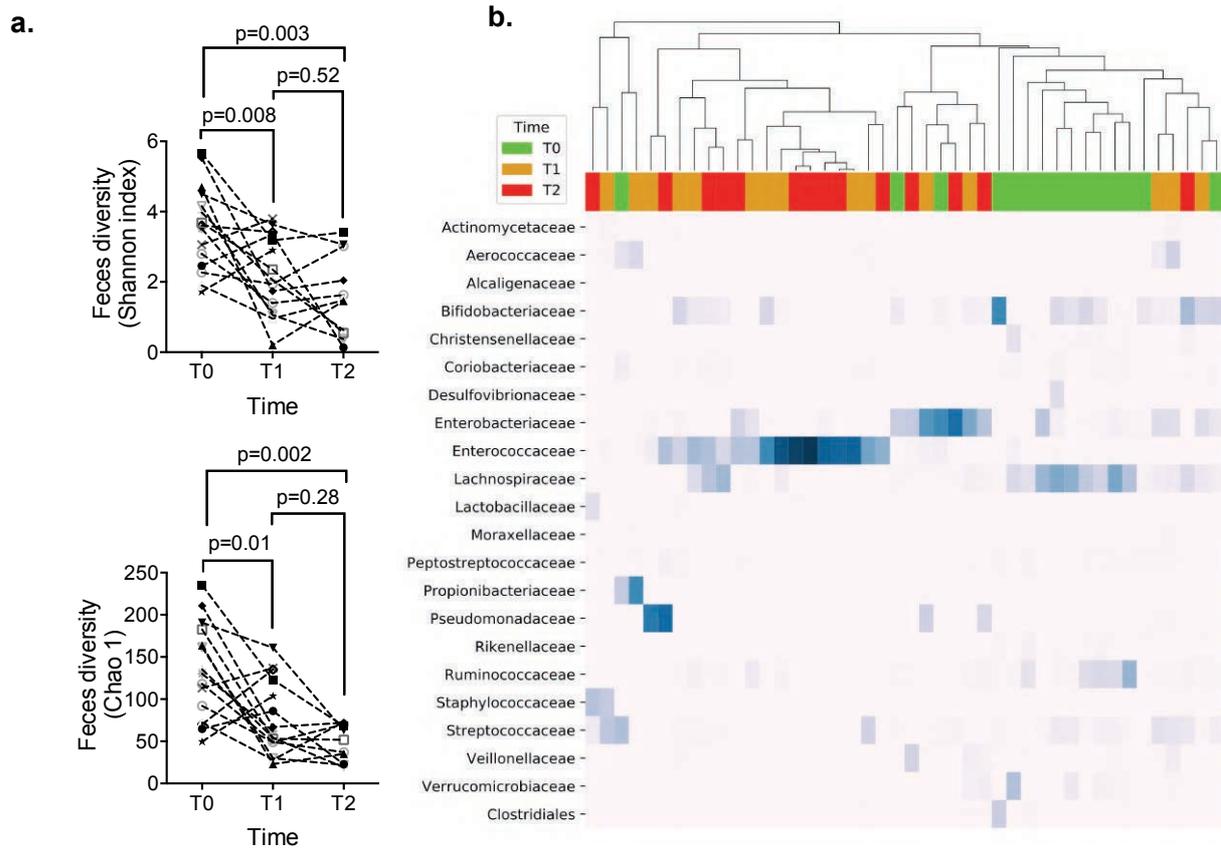
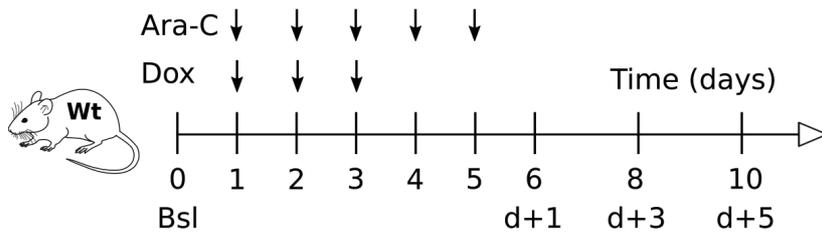


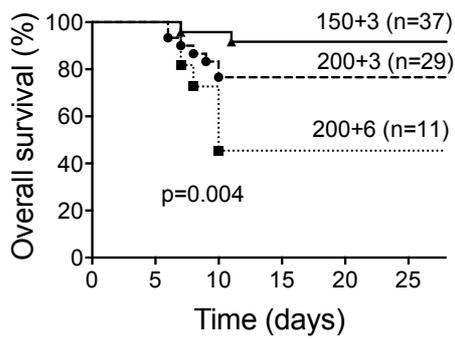
Figure 2.

a. Alpha diversity of microflora in patients' feces, represented by the Shannon index and Chao-1 index before induction (T0), during aplasia (T1) and after hematological recovery (T2). The Friedman test for multiple comparisons (T0, T1, T2) and Wilcoxon signed-rank test to compare T0 vs. T1 (n=15) and T1 vs. T2 (n=14) were used, $p < 0.05$ is considered significant. **b.** The heatmap highlighted a clustering of two groups dominated by *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* at T0 and progressively replaced by *Enterococcaceae* or *Enterobacteriaceae* at T1 and T2.

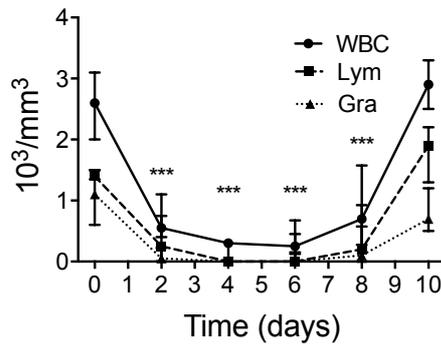
a.



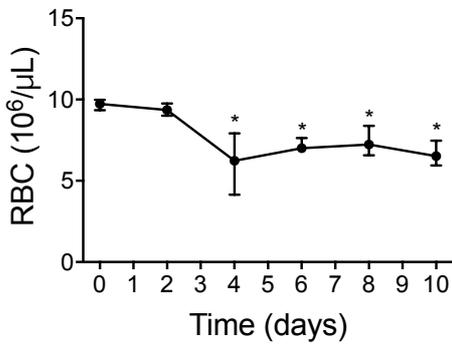
b.



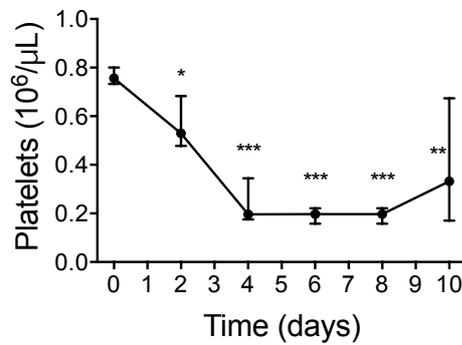
c.



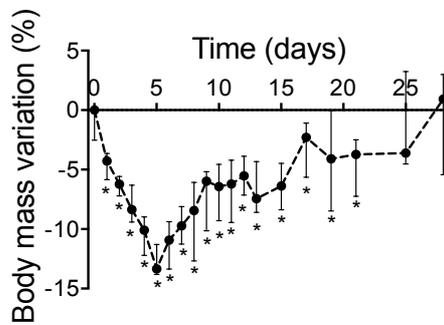
d.



e.



f.



g.

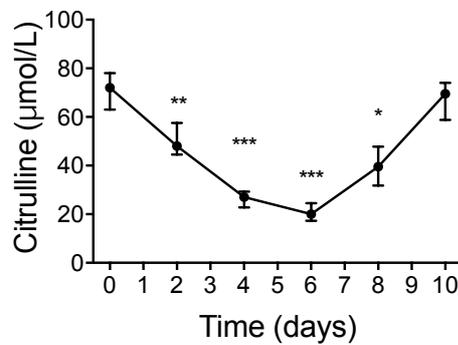
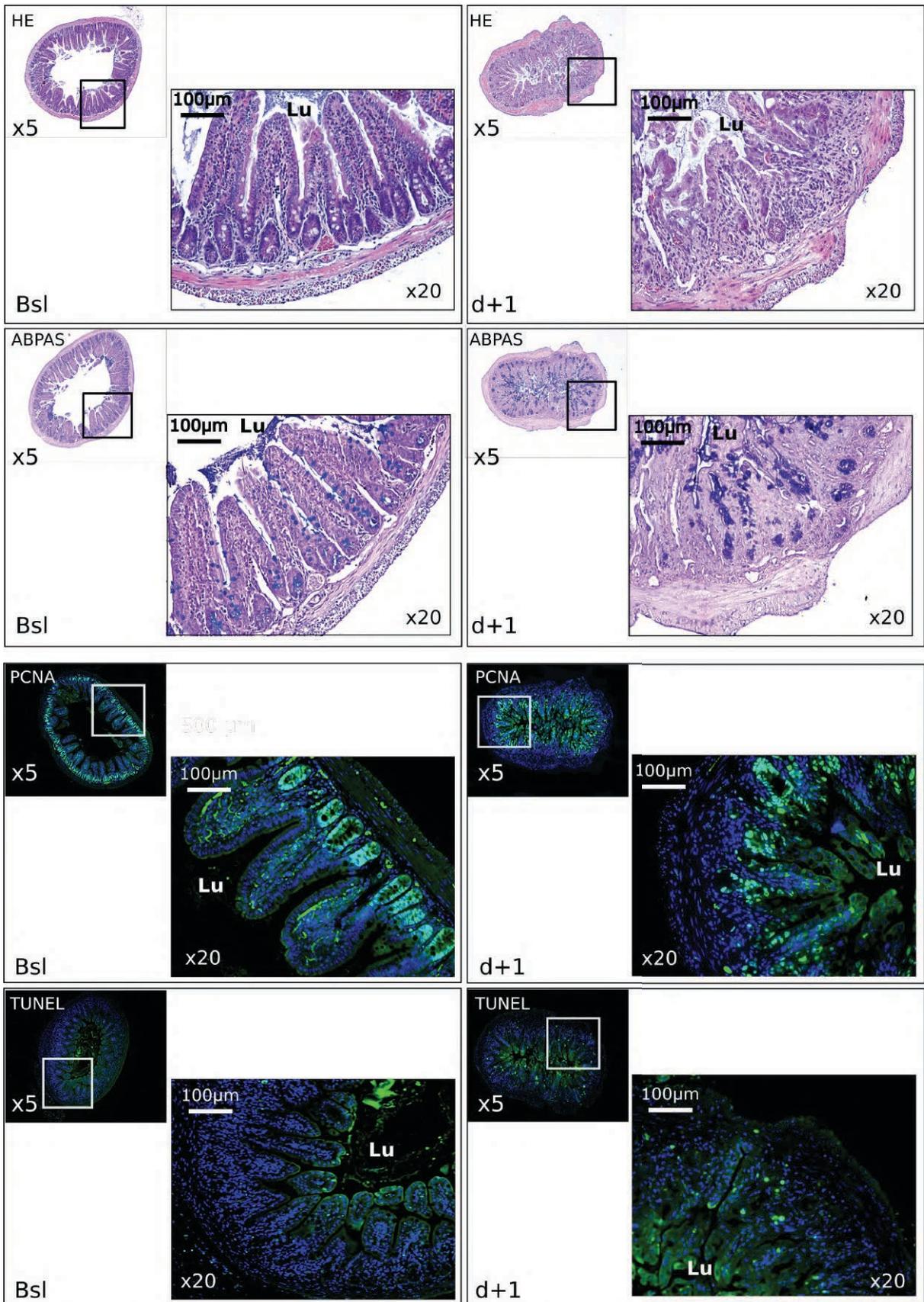


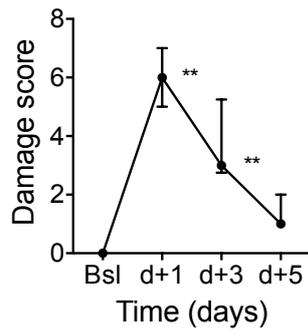
Figure 3.

a. Induction chemotherapy in wild-type mouse model consisted of a combined administration of aracytine (Ara-C) during 5 days and doxorubicin (Dox) during 3 days injected intraperitoneally. Baseline (Bsl) corresponded to the time before chemotherapy administration; d+1, d+3 and d+5 corresponded to one day, three days and five day after the completion of chemotherapy. **b.** Increasing dose over 150 mg/kg/d and 3 mg/kg/d (dotted lines), respectively, responsible for a high rate of mortality. **c to g.** A model with Ara 150 mg/kg/d and Dox 3 mg/kg/d (plain lines) was elected resulting in decrease of blood count body weight and plasma citrulline level (n=10 to 15 at each time). Wt: wild-type B6D2F1; WBC: white blood count; Lym: lymphocyte; Gra: granulocytes; RBC: Red blood count. A log-rank test was used to compare overall survival between chemotherapy groups. The Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and Mann-Whitney test were used to compare Bsl with different time after chemotherapy completion. $p < 0.05$ is considered significant, * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001

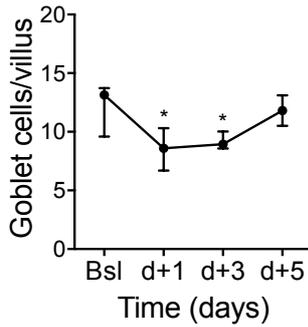
a.



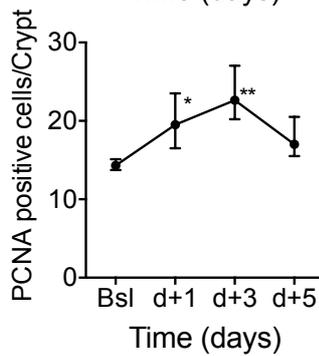
b.



c.



d.



e.

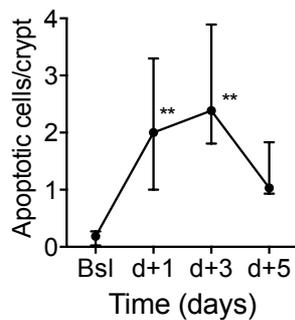


Figure 4.

a. Histological analyses of terminal ileum mucosa demonstrated the epithelium impairment at d+1 compared to Bsl. **b to e.** Increase of damage score, PCNA staining, apoptosis and decrease of goblet cells at d+1 and d+3 that reached normal values at d+5. (n= 7 to 10 at each time). HE: Hemalun-hematoxylin; ABPAS: Alcian blue/periodic-acid Schiff; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; Lu: lumen. The Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and Mann-Whitney test were used to compare Bsl to d+1, d+3 and d+5 p<0.05 significant, *<0.05; **<0.01.

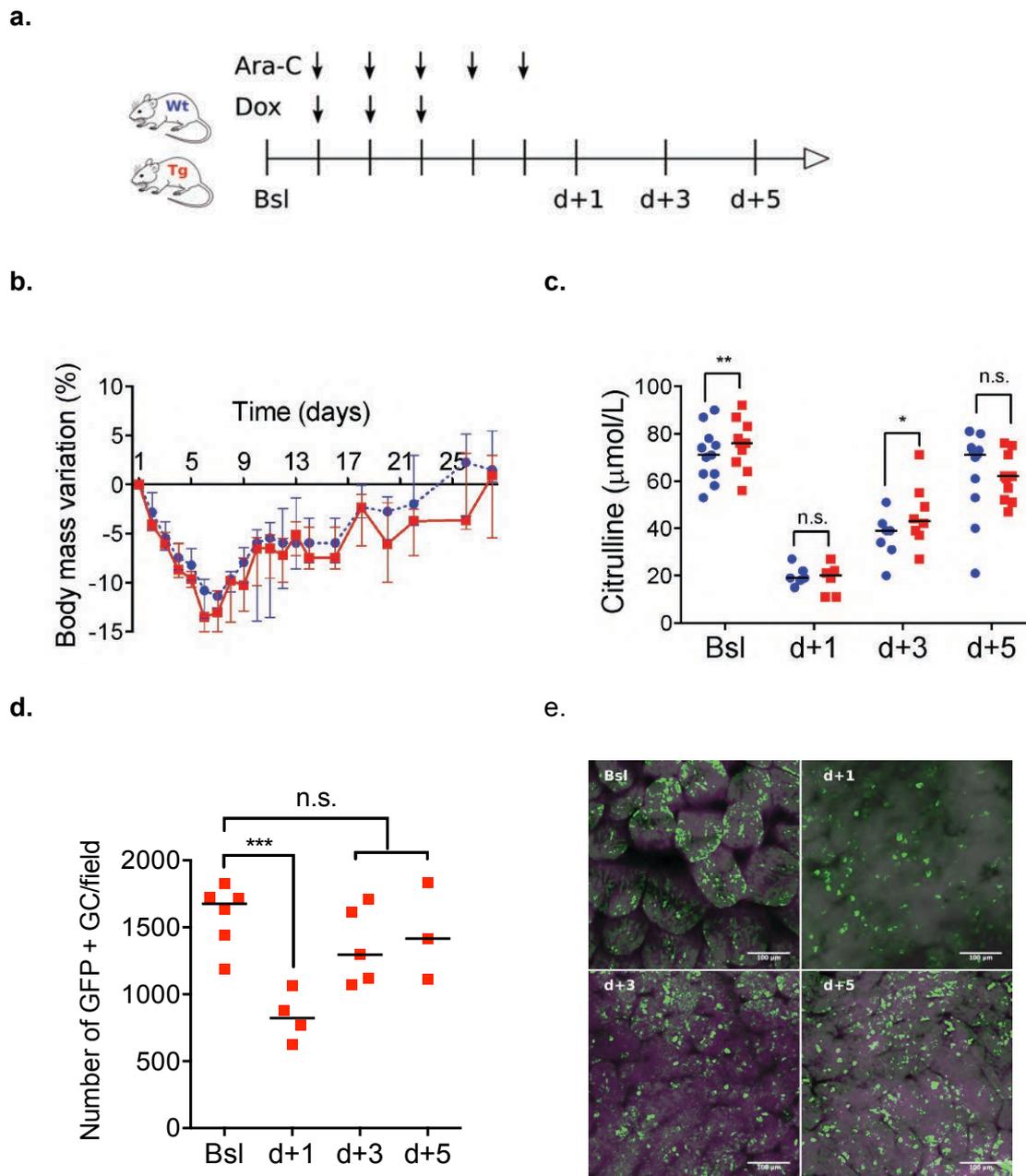
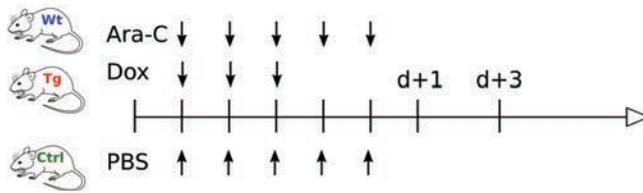


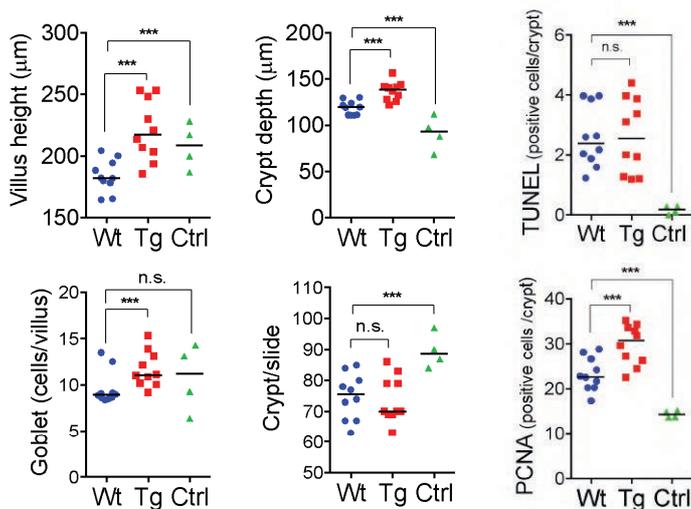
Figure 5.

a. Induction chemotherapy model in Wt and Tg mice. **b-c.** Comparison of weight loss and plasma citrulline level of Wt (blue circles) and Tg mice (red squares) at baseline (Bsl) and d+1, d+3 and d+5 after chemotherapy completion. **d-e.** Tracking of GFP-tagged transgene using epifluorescence microscopy in ileal lumen of Tg mice from Bsl to d+5. GC : Goblet cells; Ara-C: aracytine; Dox: doxorubicin. The Friedman test for multiple comparisons and Wilcoxon signed-rank test were used to compare Wt and Tg mice of the same litter at each time. $p < 0.05$ is considered significant, n.s., not significant. * < 0.05 ; ** < 0.01 .

a.



b.



c.

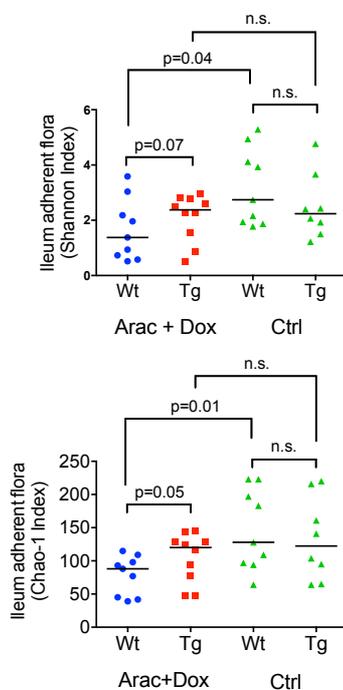
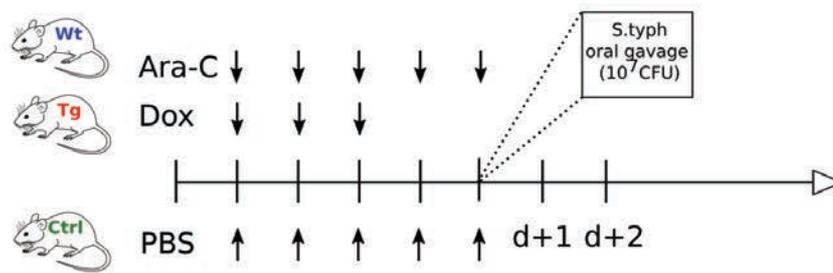


Figure 6.

a- b. Histological analyses at d+3 after completion of induction chemotherapy in Wt (blue circles), Tg (red squares) and controlled (Ctrl) mice (green triangles) which received PBS instead of chemotherapy (Ctrl group included 2 Tg and 2 Wt mice). The Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and Mann-Whitney test were used to compare the groups. **c.** Next generation sequencing analyses in ileum adherent flora at d+3 in Wt and Tg mice and in chemotherapy and ctrl groups. Ara-C: aracytine; Dox: doxorubicin; PBS: phosphate-buffered saline. The Mann-Whitney test was used for comparisons between control and chemotherapy groups and Wilcoxon signed-rank test for comparisons between Wt and Tg mice from the same litter. $p < 0.05$ is considered significant; n.s., not significant.

a.



b.

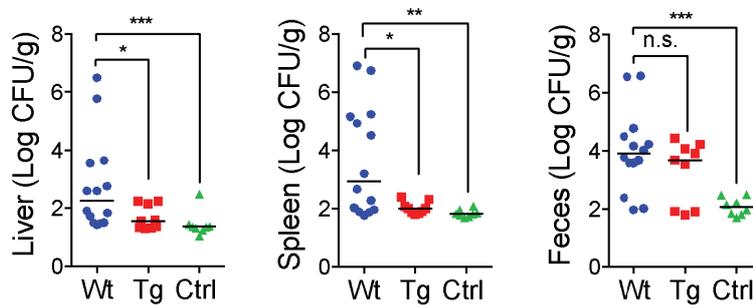


Figure 7.

a. Oral gavage of 10⁷ CFU of Salmonella (*S.*) Typhimurium was realized the last day of chemotherapy regimen in Wt, Tg and Ctrl mice. **b.** Comparison of intestinal translocation of Salmonella (*S.*) Typhimurium in Wt (blue circles), Tg (red squares) and Ctrl mice (green triangles) in liver spleen and feces at d+2 after oral gavage. Ara-C: aracytine; Dox: doxorubicin; PBS: phosphate-buffered saline. CFU : Colony form-unit. Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and Mann-Whitney test were used to compare Wt, Tg and Ctrl mice. $p < 0.05$ is considered significant, n.s., not significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplementary data

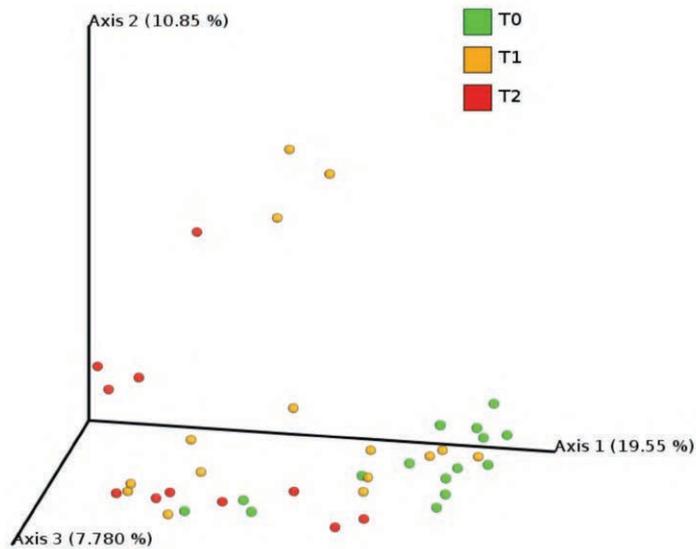


Figure S1. Unweighted Unifrac principal component analysis showed the clusterization of the three groups of samples. T0 : Before induction; T1: during aplasia; T2 : after hematological recovery.

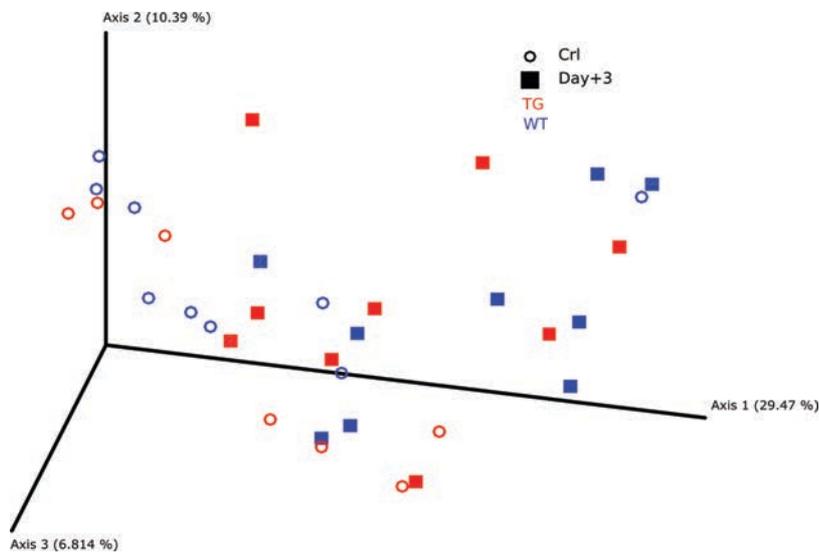
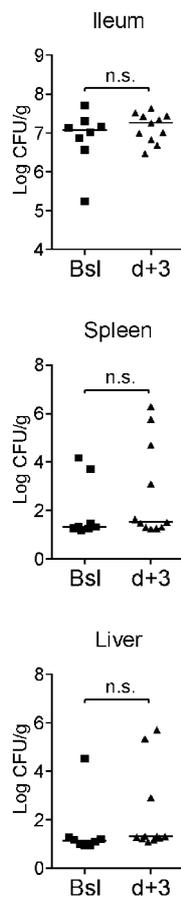


Figure S2. Unweighted Unifrac principal component analysis. Control mice with Tg222 (red circle) and Wt mice (blue circle) are represented. At three days after chemotherapy completion, Tg222 (red square) and Wt mice (blue square) are represented.

a.



b.

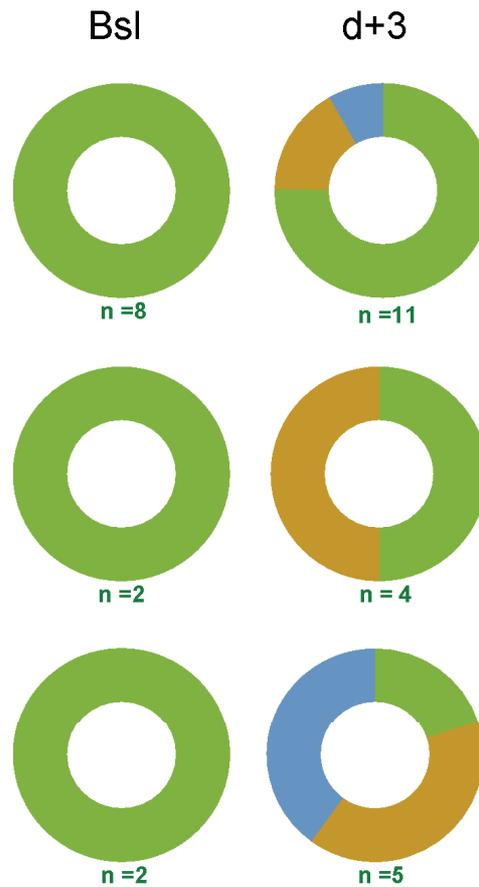


Figure S3.

a. Bacterial colonization in terminal ileum and translocation in spleen and liver at baseline (Bsl) and d+3, after completion of induction chemotherapy in WT mice **b.** The mass spectrometry (MALDI-TOFF) identified exclusively *Lactobacillus* spp (green circle) at Bsl and also *Escherichia (E.) coli* (blue circle) and/or *Enterococcus* spp (orange circle) at d+3 in ileum, spleen and liver. Bsl: Baseline; d+3: Three days after chemotherapy completion; CFU: colony form unit; Mann Whitney test was used. n.s.: not significant.

II. Article 2 : Citrulline and monocyte-derived macrophages before conditioning predict acute Graft-versus-Host disease

II. A. Présentation et résultats de l'étude

Les travaux sur modèle murin de GvH aiguë ont montré que l'atteinte de la barrière intestinale par le conditionnement constituait la première étape de la physiopathologie de la GvH aiguë. L'objectif de ce travail était d'évaluer de manière indirecte, l'influence de la santé intestinale et la réactivité des CPA, dans une série de patients avant qu'ils ne reçoivent leur conditionnement d'allo-CSH.

Cette étude a été menée sur une cohorte de 45 patients, 1 mois avant que ne soit réalisée leur allo-CSH. La citrulline plasmatique a été dosée. Les effets de la translocation intestinale sur la réactivité des macrophages issus de monocytes circulants ont été reproduits *in vitro* en les stimulant avec différents PAMPS. Une citrulline basse et une réactivité des macrophages augmentée avant le conditionnement étaient associées à la survenue d'une GvH aiguë après la greffe. Une citrulline < 20 µmol/L, un taux d'IL-6 > 332 g/mL et d'IL-10 > 90 pg/mL étaient des facteurs indépendants de survenue de GvH aiguë au même titre que le conditionnement myéloablatif. Ces données corroborent nos précédents résultats et suggèrent que les traitements tels que l'induction de chimiothérapie, les consolidations induisent des dommages intestinaux responsables de la translocation de dérivés microbiens modifiant la réactivité des macrophages. Dans ce contexte, une citrulline basse avant le greffe constituait un stigmate d'atteinte intestinale infra-clinique séquellaire de ces traitements. Pour la première fois, cette étude montre qu'il existe des paramètres biologiques permettant de détecter avant la procédure de greffe, les patients à risque de faire une GvH aiguë.

II. B. Article

III. Article 3 : Association between low plasma level of citrulline before allogeneic stem cell transplantation and severe gastrointestinal Graft vs. Host disease

III. A. Présentation et résultats de l'étude

Afin d'évaluer la robustesse de la citrulline en tant que marqueur précoce de survenue de GvH aiguë, nous avons évalué la citrulline plasmatique 1 mois avant le conditionnement d'allo-CSH sur une cohorte de 191 patients et son association avec la survenue de GvH intestinale grave. Après analyse de la courbe ROC, un taux de 26 $\mu\text{mol/L}$ était considéré comme le plus relevant. En analyse univariée, un taux de citrulline plasmatique $< 26 \mu\text{mol/L}$ était significativement associé à la survenue d'une GvH intestinale stade 2-4, à une mortalité non associée à la rechute (NRM) plus élevée, et à une diminution de la survie globale à 2 ans après la greffe. Inversement, ce seuil n'était pas associé au taux de rechute. En analyse multivariée, une citrulline $< 26 \mu\text{mol/L}$ restait le marqueur prédictif le plus robuste de GvH intestinale stade 2-4 et de NRM comparé au Hematopoietic cell transplant-specific comorbidity index (HCT-CI) score. En revanche elle n'était pas associée de manière significative à une survie globale plus faible contrairement au Disease Risk Index (DRI).

Les résultats supplémentaires ont également mis en évidence un taux de citrulline d'autant plus bas que le grade de la GvH aiguë était sévère. Un taux de citrulline $< 26 \mu\text{mol/L}$ était également associé à la survenue d'une GvH aiguë grade III-IV. Ces résultats doivent maintenant être validés sur une cohorte indépendante. Ils confortent toutefois la sensibilité de la citrulline et l'intérêt potentiel de son utilisation avant la greffe afin de cibler les patients à risque de GvH aiguë et/ou intestinale grave.

III. B. Article

Discussion

L'atteinte de la barrière intestinale lors de l'administration de fortes doses de chimiothérapies ou suite à une allo-CSH est connue de longue date mais sa physiopathologie reste peu décrite : Il existe peu de données disponibles concernant l'atteinte de la barrière intestinale en contexte de chimiothérapie d'induction de LAM. Nos résultats suggèrent que cette chimiothérapie d'induction provoque des dommages de la barrière intestinale à la fois à court terme responsables de complications infectieuses, mais aussi à long terme, en prédisposant ces patients à développer une GvH aiguë après la greffe. Inversement, un renforcement de l'effet de barrière, dont la preuve de concept est apportée ici par la modification des propriétés physico-chimiques du mucus intestinal, pourrait limiter ces complications et améliorer la prise en charge des patients atteints de LAM.

La première partie de ce travail a permis d'évaluer l'atteinte de la barrière intestinale sur une série de 15 patients atteints de LAM bénéficiant d'une chimiothérapie d'induction selon le schéma « 3+7 ». Durant cette étude observationnelle, l'ensemble des patients a présenté une aplasie fébrile pour laquelle des antibiotiques à large spectre ont été administrés. L'étude de la cinétique de leur citrulline plasmatique suggère que la chimiothérapie d'induction provoque une atteinte de la masse entérocytaire fonctionnelle, qui s'avère réversible à la sortie d'aplasie. L'effondrement de la grande majorité des genres bactériens tels que les *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, et *Clostridium* au profit des entérocoques et entérobactéries apparaît quant à lui plus durable. A notre connaissance, il s'agit de la première étude humaine mettant en évidence une évolution de la masse entérocytaire fonctionnelle associée à une atteinte des populations microbiennes au cours d'une chimiothérapie d'induction.

Les effets toxiques de la chimiothérapie sur le microbiote intestinal ont été évoqués par Van Vliet *et al.* sur une population pédiatrique atteinte de LAM. En accord avec nos

observations, ce travail a mis en évidence une diminution progressive des *Clostridium*, des *Bacteroides* et des *Bifidobacterium* dans les fèces suite aux différentes cures de chimiothérapie, favorisant ainsi la colonisation par des bactéries tels que les entérocoques considérés comme potentiellement pathogènes. Ces mêmes bactéries mises en culture ont été soumises *in vitro* à différentes doses de chimiothérapie, révélant un effet toxique de la daunorubicine mais pas de l'aracytine sur la pousse des bactéries anaérobies¹⁹⁰. La même équipe avait d'ailleurs évalué sur une cohorte pédiatrique de patients atteints d'une LAM, la citrulline comme marqueur d'atteinte de la barrière lors d'une chimiothérapie¹⁹¹. Notre étude humaine combinait ces deux approches, mais l'utilisation systématique d'antibiotiques chez ces patients était susceptible de modifier l'effet de la chimiothérapie.

Nous avons contourné cet obstacle en utilisant un modèle murin de chimiothérapie sans ajout d'aucun antibiotique. Les chimiothérapies injectées par voie intra-péritonéale aux souris était une adaptation de celles utilisées lors de l'induction de la LAM chez l'homme^{192,193}. Notre étude a confirmé que dans les 48h à 72h suivant la fin de la chimiothérapie, il existe une augmentation de l'apoptose au sein des cryptes et une diminution de la taille des villosités intestinales. Le challenge bactérien a permis de mettre en évidence une évolution du processus de la translocation intestinale en deux phases : une phase de colonisation, favorisée par la dysbiose, suivie d'une phase de translocation responsable de septicémie. Ces résultats confirment que la diminution de la diversité microbienne est directement corrélée à la survenue de bactériémies précédemment décrite chez l'homme¹⁹⁴.

Chez l'homme, le parallèle peut être fait avec l'émergence d'entérocoques résistants à la vancomycine au sein du tube digestif, précédant la survenue de bactériémies¹⁹⁵. Contrairement à l'étude humaine, nous n'avons pas constaté un effondrement de l'ensemble des populations bactériennes au profit de souches aérotolérantes telles que *E.Coli*, et *enterococcus* spp. Cependant, il faut noter que nous avons analysé les iléons terminaux des souris où prédominent habituellement les

lactobacilles, alors que dans les selles humaines ce sont les bactéroïdes qui sont prédominants.

Par ailleurs, ce travail a montré l'intérêt potentiel de renforcer l'effet de barrière *via* notre modèle murin transgénique sécrétant un mucus renforcé qui préserve l' α -diversité, améliorant ainsi la réparation tissulaire et limitant la translocation intestinale. A notre connaissance peu de travaux sont disponibles sur le potentiel effet barrière du mucus au cours de la chimiothérapie. Cette approche ouvre la possibilité de moduler l'effet barrière tout en préservant la diversité microbienne. En outre, il sera pertinent d'étudier le comportement de ce modèle transgénique, en ajoutant à la chimiothérapie des antibiotiques, afin de voir s'il conserve ses avantages en terme de réparation tissulaire et de réduction de la translocation intestinale.

Ce premier travail a démontré chez l'homme comme chez la souris, la sensibilité et la reproductibilité de la citrulline plasmatique en tant que marqueur de l'atteinte de la trophicité intestinale suite à la chimiothérapie. Dans le second article, nous avons donc étudié la citrulline comme marqueur prédictif précoce de GvH aiguë. Convaincus du rôle primordial de la translocation intestinale dans la physiopathologie de la GvH, nous avons observé la citrulline et la réactivité des macrophages circulants 1 mois avant la procédure d'allogreffe. Il s'avère qu'une citrulline basse et une réactivité des macrophages augmentée (sous la forme d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6 après stimulation microbienne) sont prédictifs de la survenue d'une GvH aiguë. L'intérêt de la citrulline dans ce contexte a été confirmé par le troisième travail réalisé à partir d'une cohorte de 191 patients allogreffés. Une citrulline $< 26 \mu\text{mol/L}$ avant greffe y était associée à la survenue d'une GvH aiguë stade III-IV et à une augmentation de la mortalité sans rechute.

Plusieurs travaux se sont intéressés aux biomarqueurs de GvH aiguë. Parmi ceux évoqués dans la littérature, les interleukines directement impliquées dans la physiopathologie de la GvH ont été largement investiguées mais ne sont pas utilisées de manière courante^{196,197}. Le suppression of tumorigenicity 2 (ST2) est le biomarqueur qui présente la plus grande corrélation avec la résistance au traitement et la mortalité sans

rechute à 6 mois, lorsque celui-ci est dosé au moment de l'initiation du traitement de la GvH. Il était également prédictif de la mortalité globale lorsqu'il est évalué à J+14 notamment¹⁹⁸. Le REG3 α a fait également l'objet d'un intérêt particulier. Il s'agit d'une défensine dont le taux permet de distinguer les patients présentant une GvH digestive basse, d'une diarrhée non liée à la GvH. Ce paramètre est aussi prédictif de la mortalité sans rechute à 1 an¹⁹⁶. Différents panels de biomarqueurs ont été testés avec l'objectif d'affiner la prédiction de la réponse au traitement et la mortalité non liée à la rechute^{199,200}.

La citrulline n'ayant pas été validée sur une cohorte indépendante, elle ne peut encore être considérée à ce jour comme un biomarqueur de GvH aiguë. Cependant, elle apparaît dans notre cohorte comme le marqueur prédictif le plus précoce de GvH aiguë et de mortalité non liée à la rechute jamais décrit. A la différence des autres biomarqueurs, la citrulline pourrait permettre de modifier ainsi la prise en charge du patient en amont du conditionnement.

En conclusion ce travail précise la nature de l'atteinte intestinale au cours de la chimiothérapie d'induction et révèle la citrulline comme un marqueur précoce de la survenue de GvH. L'impact intestinal de la chimiothérapie est majeur : atteinte transitoire de l'épithélium, la persistance d'une dysbiose et d'une atteinte infra-clinique pouvant faire le lit de la GvH aiguë. Notre modèle murin transgénique montre l'intérêt de renforcer la barrière de mucus afin d'améliorer la réparation tissulaire, de préserver la diversité microbienne et de limiter la translocation bactérienne. La préservation de la barrière et son renforcement apparaissent ainsi comme une approche prometteuse afin de limiter la toxicité de la chimiothérapie et d'améliorer la prise en charge des patients atteints de LAM.

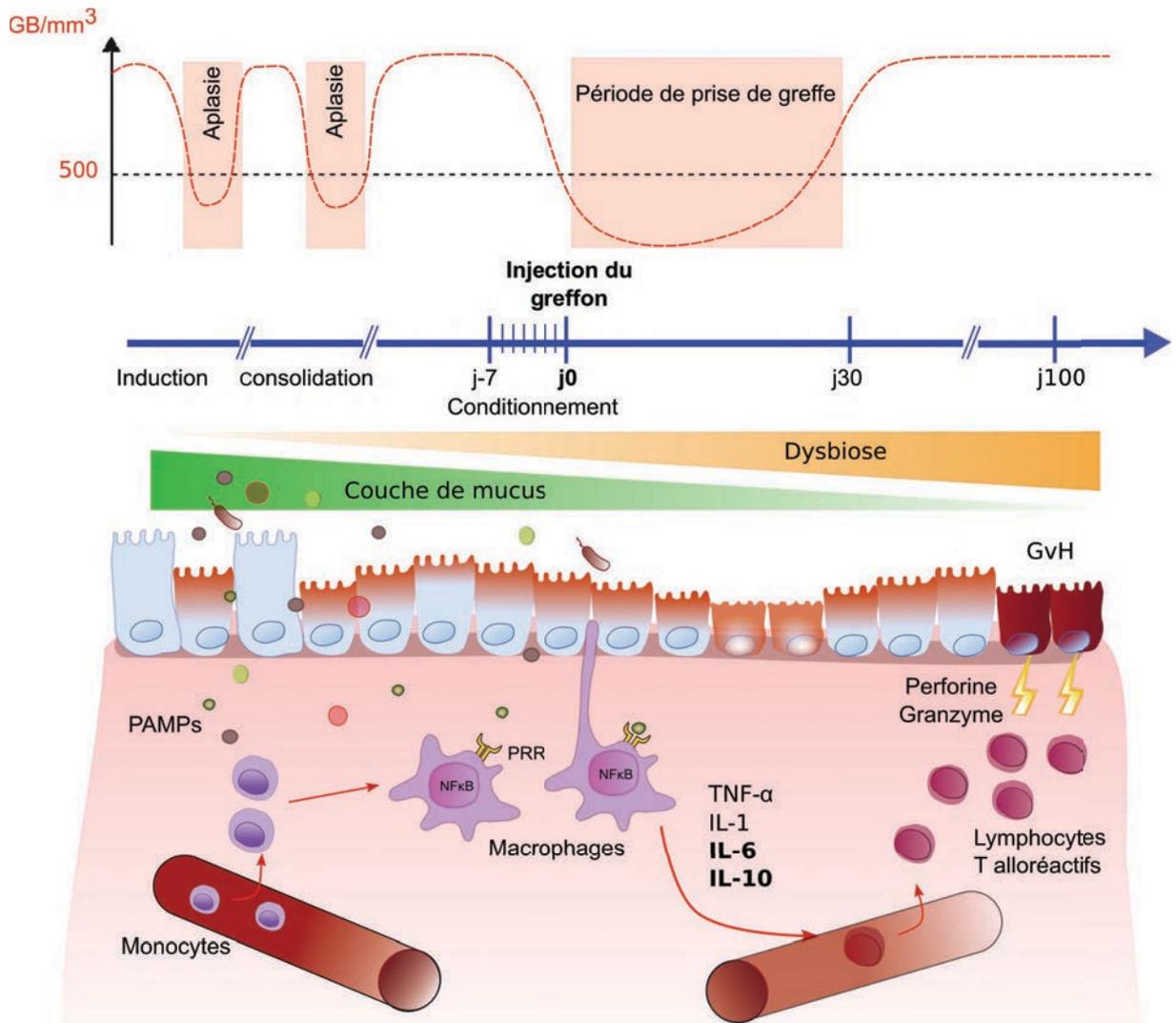


Figure 15. Représentation schématique de l'atteinte de la barrière intestinale au cours du traitement des LAM

Références

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458.
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-1152.
5. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-448.
6. Nakanl Mi, Tanaka K, Shintani T, Takahashi T, Kamada N. Chromosomal Instability in Acute Myelocytic Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients among Atomic Bomb Survivors. *J Radiat Res*. 1999;40(2):159-167.
7. Linet MS, Yin S-N, Gilbert ES, et al. A retrospective cohort study of cause-specific mortality and incidence of hematopoietic malignancies in Chinese benzene-exposed workers. *Int J Cancer*. 2015;137(9):2184-2197.
8. Morton LM, Dores GM, Tucker MA, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood*. 2013;121(15):2996-3004.
9. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-2107.
10. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary Remission in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med*. 1948;238(23):787-793.
11. Boiron M, Jacquillat C, Weil M, et al. Daunorubicin in the treatment of acute myelocytic leukaemia. *Lancet*. 1969;1(7590):330-333.
12. Henderson ES. Treatment of Acute Leukemia. *Ann Intern Med*. 1968;69(3):628-632.
13. Crowther D, Bateman CJT, Vartan CP, et al. Combination chemotherapy using l-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J*. 1970;4(5734):513-517.
14. Yates JW, Wallace HJ, Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC 63878) and daunorubicin (NSC 83142) therapy in acute non lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep*. 1973;57(4):485-488.
15. Murphy T, Yee KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid

- leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(16):1765-1780.
16. Lee J-H, Kim H, Joo Y-D, et al. Prospective Randomized Comparison of Idarubicin and High-Dose Daunorubicin in Induction Chemotherapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(24):2754-2763.
 17. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: A meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):986-996.
 18. Röllig C, Serve H, Hüttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): A multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1691-1699.
 19. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-464.
 20. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, et al. Cpx-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients with Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2018;36(26):2684-2692.
 21. Gunz FW, Bach BI, Crossen PE, Mellor JE, Singh S, Vincent PC. Relevance of the cytogenetic status in acute leukemia in adults. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50(1):55-61.
 22. Vincent PC, Sutherland R, Bradley M, Lind D, Gunz FW. Marrow Culture Studies in Adult Acute Leukemia at Presentation and During Remission. *Blood*. 1977;49(6):903-912.
 23. Mauer AM. New Direction in The Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 1986;315(5):316-317.
 24. Gale RP. Advances in The Treatment of Acute Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med*. 2009;300(21):1189-1199.
 25. Cassileth PA, Begg CB, Mark B, Benham KS, Weiler C, Glick JH. A Randomized Study of the Efficacy of Consolidation Therapy in Adult Acute Nonlymphocytic Leukemia. *Blood*. 1984;63(4):843-847.
 26. Tricot G, Boogaerts MA, Vlietinck R, Emonds MP, Verwilghen RL. The role of intensive remission induction and consolidation therapy in patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 1987;66(1):37-44.
 27. Wolff SN, Herzig RH, Fay JW, et al. High-dose cytarabine and daunorubicin as consolidation therapy for acute myeloid leukemia in first remission: Long-term follow-up and results. *J Clin Oncol*. 1989;7(9):1260-1267.
 28. Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(1):26-28.
 29. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*. 1959;38(10):1709-1716.

30. Thomas ED, Collins JA, Herman EC, Ferrebee JW. Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. *Blood*. 1962;19:217-228.
31. Mathé G, Amiel JL, Niemetz J. Greffes de moelle osseuse apres irradiation totale chez des souris leucemiques suivies de l' administration d 'un produit antimetabolique. *Bull World Health Organ*. 1962;26(5):692-695.
32. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: More than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(6):786-792.
33. Shlomchik WD. Graft versus host diseases. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(May):340-352.
34. Klein J, Sato A. The HLA System. First of Two Parts. *N Engl J Med*. 2000;343(10):702-709.
35. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, 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 . *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5695-5702.
36. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2012;119(17):3908-3916.
37. Appelbaum FR. Alternative donor transplantation for adults with acute leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(3-4):272-277.
38. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative Conditioning and High-Dose, Posttransplantation Cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641-650.
39. Ciurea SO, Zhang MJ, Bacigalupo AA, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(8):1033-1040.
40. Ruggeri A, Labopin M, Sanz G, et al. Comparison of outcomes after unrelated cord blood and unmanipulated haploidentical stem cell transplantation in adults with acute leukemia. *Leukemia*. 2015;29(9):1891-1900.
41. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1487-1496.
42. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(12):1628-1633.
43. Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)–specific comorbidity index : a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-2919.
44. Ho VT, Revta C, Richardson PG. Hepatic veno-occlusive disease after

- hematopoietic stem cell transplantation: Update on defibrotide and other current investigational therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(3):229-237.
45. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15(10):1143-1238.
 46. Cannas G, Pautas C, Raffoux E, et al. Infectious complications in adult acute myeloid leukemia: analysis of the Acute Leukemia French Association-9802 prospective multicenter clinical trial. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(6):1068-1076.
 47. Conn JR, Catchpoole EM, Runnegar N, Mapp SJ, Markey KA. Low rates of antibiotic resistance and infectious mortality in a cohort of high-risk hematology patients: A single center, retrospective analysis of blood stream infection. *PLoS One.* 2017;12(5):1-13.
 48. Rorije NMG, Shea MM, Satyanarayana G, et al. BK virus disease after allogeneic stem cell transplantation: A cohort analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(4):564-570.
 49. Nucci M, Anaissie E. How we treat invasive fungal diseases in patients with acute leukemia. *Blood.* 2014;124(26):3858-3870.
 50. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(12):945-956.
 51. Przepiorka BD, Smith TL, Folloder J, et al. Risk Factors for Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation. 1999:1465-1470.
 52. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative Analysis of Risk Factors for Acute GvHD and for Chronic GvHD disease according to NIH consensus Criteria. *Blood.* 2011;117(11):3214-3219.
 53. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295-304.
 54. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15(6):825-828.
 55. Yakoub-Agha I, Maunoury V, Wacrenier A, et al. Impact of Small Bowel Exploration Using Video-Capsule Endoscopy in the Management of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Transplantation.* 2004;78(11):1697-1701.
 56. Billingham R. The biology of graft-versus-host reactions . *Harvey Lect.* 1967;62:21-78.
 57. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1992;80(12):2964-2968.
 58. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5(6):347-356.

59. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000;95(9):2754-2759.
60. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
61. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. 1997;90(8):3204-3213.
62. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1992;175(2):405-413.
63. Heidegger S, van den Brink MRM, Haas T, Poeck H. The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2014;5(July):1-7.
64. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CBB, et al. Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host. *Science*. 1999;285(July):412-415.
65. Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med*. 2004;10(9):987-992.
66. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;105(11):4191-4199.
67. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 1994;265(5171):528-530.
68. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*. 1994;370(6491):650-652.
69. Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, et al. Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 1998;102(10):1882-1891.
70. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, et al. Methotrexate and Cyclosporine Compared with Cyclosporine Alone for Prophylaxis of Acute Graft versus Host Disease after Marrow Transplantation for Leukemia. *N Engl J Med*. 1986;314(12):729-735.
71. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92(7):2303-2314.
72. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B, et al. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34(7):621-625.
73. Cutler C, Li S, Ho VT, et al. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2007;109(7):3108-3114.

74. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(9):855-864.
75. Mohty M, Labopin M, Balère ML, et al. Antithymocyte globulins and chronic graft-vs-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation from HLA-matched unrelated donors: A report from the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Leukemia.* 2010;24(11):1867-1874.
76. Lee CJ, Savani BN, Mohty M, et al. Haploidentical hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia: A position statement from the acute leukemia working party of the European society for blood and marrow transplantation. *Haematologica.* 2017;102(11):1810-1822.
77. Pavletic SZ, Fowler DH. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:251-264.
78. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, et al. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(7):387-394.
79. Bolaños-Meade J, Logan BR, Alousi AM, et al. Phase 3 clinical trial of steroids/mycophenolate mofetil vs steroids/placebo as therapy for acute GVHD: BMT CTN 0802. *Blood.* 2014;124(22):3221-3227
80. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: A randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood.* 2009;114(3):511-517.
81. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: A multicenter survey. *Leukemia.* 2015;29(10):2062-2068.
82. von Bubnoff N, Ihorst G, Grishina O, et al. Ruxolitinib in GvHD (RIG) study: a multicenter, randomized phase 2 trial to determine the response rate of Ruxolitinib and best available treatment (BAT) versus BAT in steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGvHD) (NCT02396628). *BMC Cancer.* 2018;18(1):1132.
83. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(3):389-401.e1. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001
84. Carpenter PA, Kitko CL, Elad S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: V. The 2014 Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(7):1167-1187.
85. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, et al. Consensus conference on clinical practice in chronic GVHD: Second-line treatment of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(1):1-17.
86. Magro L, Gauthier J, Richet M, et al. Scleral lenses for severe chronic GvHD-related

- keratoconjunctivitis sicca: A retrospective study by the SFGM-TC. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(6):878-882.
87. Magro L, Forcade E, Giraud C, et al. Management of the chronic graft versus host disease: Guidelines from the Francophone society of bone marrow transplantation and cellular therapies (SFGM-TC). *Bull Cancer*. 2017;104(12):S145-S168.
 88. Savani BN, Griffith ML, Jagasia S, Lee SJ. How I treat late effects in adults after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117(11):3002-3009.
 89. Nalle SC, Turner JR. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. *Mucosal Immunol*. 2015;8(April):1-11.
 90. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
 91. Williamson RCN. Intestinal Adaptation. *N Engl J Med*. 1978;298(25):1393-1402.
 92. Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013;54(9):2325-2340.
 93. Rivera-Chávez F, Zhang LF, Faber F, et al. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):443-454.
 94. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF- κ B activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 2000;118(4):724-734.
 95. Johansson MEV, Holmén Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1):4659-4665.
 96. Asker N, Axelsson MAB, Olofsson SO, Hansson GC. Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 1998;273(30):18857-18863.
 97. Johansson MEV, Gustafsson JK, Holmen-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281-291.
 98. Zarepour M, Bhullar K, Montero M, et al. The mucin muc2 limits pathogen burdens and epithelial barrier dysfunction during salmonella enterica serovar typhimurium colitis. *Infect Immun*. 2013;81(10):3672-3683.
 99. Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):352-361.
 100. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-1638.
 101. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability

- and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220-230.
102. Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet*. 2013;29(1):51-58.
 103. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647-1651.
 104. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-180.
 105. Sartor RB. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-594.
 106. Walter J, Ley R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65(1):411-429.
 107. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: Friends or foes? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(10):735-744.
 108. Westcarr S, Farshori P, Wyche J, Anderson WA. Apoptosis and differentiation in the crypt-villus unit of the rat small intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999;31(1):15-30.
 109. Garattini S, Guaitani A, Nanni E, Palma V. Studies on the Selectivity of Antitumor Agents. *Cancer Res*. 1967;27:1309-1437.
 110. Lubitz L, Ekert H. Reversible Changes in Duodenal Mucosa Associated With Intensive Chemotherapy Followed By Autologous Marrow Rescue. *Lancet*. 1979;314(8141):532-533.
 111. Bradstock KF, Matthews JP, Lowenthal RM, et al. A randomized trial of high- versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine. *Blood*. 2005;105(2):481-488.
 112. Bradstock KF, Link E, Iulio J Di, et al. Idarubicin dose escalation during consolidation therapy for adult acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(15):1678-1685.
 113. Keefe DM, Brealey J, Goland GJ, Cummins AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*. 2000;47(5):632-637.
 114. Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DM, Cummins AG. Cytotoxic chemotherapy upregulates pro-apoptotic Bax and Bak in the small intestine of rats and humans. *Pathology*. 2005;37(1):56-62.
 115. Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DMK. Intestinal mucositis: The role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*. 2006;14(7):713-731.
 116. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):277-284.
 117. Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. The burdens of cancer therapy: Clinical and economic outcomes of chemotherapy-

- induced mucositis. *Cancer*. 2003;98(7):1531-1539.
118. Keefe DMK, Cummins AG, Dale BM, Kotasek D, Robb TA, Sage RE. Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. *Clin Sci*. 1997;92(4):385-389.
 119. Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. Effect of changing intestinal flow rate on a measurement of intestinal permeability. *Gastroenterology*. 1995;108(4):983-989.
 120. Buchman AL, Ament ME, Jenden DJ, Ahn C. Choline deficiency is associated with increased risk for venous catheter thrombosis. *J Parenter Enter Nutr*. 2006;30(4):317-320.
 121. Coëffier M, Claeysens S, Leclaire S, et al. Combined enteral infusion of glutamine, carbohydrates, and antioxidants modulates gut protein metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(5):1284-1290.
 122. Crowther M, Avenell A, Culligan DJ. Systematic review and meta-analyses of studies of glutamine supplementation in haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(7):413-425.
 123. Johansson JE, Ekman T. Gastro-intestinal toxicity related to bone marrow transplantation: disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19(9):921-925.
 124. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834.
 125. Blijlevens NMA, Donnelly JP, De Pauw BE. Mucosal barrier injury: Biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: An overview. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(12):1269-1278.
 126. Bow EJ, Meddings JB. Intestinal mucosal dysfunction and infection during remission-induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2006;20(12):2087-2092.
 127. Crenn P, Coudray Lucas C, Thuiller F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive Plasma Citrulline Concentrations Is a Marker of Absorptive Enterocyte Mass and Intestinal Failure in Humans. *Gastroenterology*. 2000;119:1446-1505.
 128. Lutgens LCHW, Blijlevens NMA, Deutz NEP, Donnelly JP, Lambin P, de Pauw BE. Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: A comparison with sugar permeability tests. *Cancer*. 2005;103(1):191-199.
 129. Blijlevens NMA, Lutgens LCHW, Schattenberg AVMB, Donnelly JP. Citrulline: a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34(3):193-196.
 130. Herbers AH, Feuth T, Donnelly JP, Blijlevens NM. Citrulline-based assessment score: First choice for measuring and monitoring intestinal failure after high-dose chemotherapy. *Ann Oncol*. 2010;21(8):1706-1711.
 131. Crenn P, Neveux N, Chevret S, et al. Plasma l-citrulline concentrations and its

- relationship with inflammation at the onset of septic shock: A pilot study. *J Crit Care*. 2014;29(2):315.e1-315.e6.
132. Herbers AHE, Blijlevens NMA, Donnelly JP, de Witte TJM. Bacteraemia coincides with low citrulline concentrations after high-dose melphalan in autologous HSCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(5):345-349.
 133. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr*. 2008;27(3):328-339.
 134. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, et al. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med*. 2011;208(2):285-294.
 135. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, et al. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2017;214(12):3507-3518.
 136. Joly A-L, Deepti A, Seignez A, et al. The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft versus host disease development. *Oncogene*. 2015;35(April):1-10.
 137. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood*. 2012;120(1):223-231.
 138. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, et al. Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease. *Immunity*. 2012;37(2):339-350.
 139. Couturier M, Lamarthée B, Arbez J, et al. IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia*. 2013;27(7):1527-1537.
 140. Noth R, Lange-Grumfeld J, Stüber E, et al. Increased intestinal permeability and tight junction disruption by altered expression and localization of occludin in a murine graft versus host disease model. *BMC Gastroenterol*. 2011;11(1):109.
 141. Marchiando AM, Shen L, Graham W vallen, et al. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1208-1218.e2.
 142. van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of Secondary Disease of Allogeneic Mouse Radiation Chimeras by Modification of the Intestinal Microflora. *J Natl Cancer Inst*. 1974;52(2):401-404.
 143. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, et al. Protective environment for marrow transplant recipients. A prospective study. *Ann Intern Med*. 1978;89(6):893-901.
 144. Vossen JM, Heidt PJ, van den Berg H, Gerritsen EJA, Hermans J, Dooren LJ. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9(1):14-23.
 145. Beelen DW, Haralambie E, Brandt H, et al. Evidence that sustained growth

- suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood*. 1992;80(10):2668-2676.
146. Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, et al. Influence of Intestinal Bacterial Decontamination Using Metronidazole And Ciprofloxacin Or Ciprofloxacin Alone On The Development Of Acute Graft-Versus-Host Disease After Marrow Transplantation In Patients With Hematologic Malignancies: Final Results And Long-term Follow-up Of An Open-Label Prospective Randomized Trial. *Blood*. 1999;93(10):3267-3275.
 147. Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, et al. CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: Increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med*. 1998;187(6):855-864.
 148. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, et al. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity*. 2009;31(4):677-689.
 149. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139(3):485-498.
 150. Taur Y, Jenq RR, Perales M, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-1182.
 151. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(8):1373-1383.
 152. Peled JU, Devlin SM, Staffas A, et al. Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35(15):1650-1659.
 153. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012;209(5):903-911.
 154. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, et al. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med*. 2016;8(339):339ra71-339ra71.
 155. Weber D, Oefner PJ, Dettmer K, et al. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016;(October 2015):1-6.
 156. Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(1):11-16.
 157. Farrell CL, Bready J V., Rex KL, et al. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Res*. 1998;58(5):933-939.
 158. Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, et al. Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. *Blood*. 1999;94(2):825-831.
 159. Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, Rubin JS, et al. Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a

- mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury. *Blood*. 2000;96(13):4350-4356.
160. Vanclée A, Lutgens LCHW, Oving EBH, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease in a novel nonmyeloablative haploidentical transplantation model. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36(10):907-915.
 161. Blazar BR, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Phase 1/2 randomized, placebo-control trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Blood*. 2006;108(9):3216-3222.
 162. Levine JE, Blazar BR, DeFor T, Ferrara JLM, Weisdorf DJ. Long-term follow-up of a phase I/II randomized, placebo-controlled trial of palifermin to prevent graft-versus-host disease (GVHD) after related donor allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(9):1017-1021.
 163. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for Oral Mucositis after Intensive Therapy for Hematologic Cancers. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2590-2598.
 164. Bradstock KF, Link E, Collins M, et al. A randomized trial of prophylactic palifermin on gastrointestinal toxicity after intensive induction therapy for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2014;167(5):618-625.
 165. Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7911-7916.
 166. Dong CX, Zhao W, Solomon C, et al. The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function. *Endocrinology*. 2014;155(2):370-379.
 167. Kissow H, Hartmann B, Holst JJ, Poulsen SS. Glucagon-like peptide-1 as a treatment for chemotherapy-induced mucositis. *Gut*. 2013;62(12):1724-1733.
 168. Bindels LB, Neyrinck AM, Loumaye A, et al. Increased gut permeability in cancer cachexia: Mechanisms and clinical relevance. *Oncotarget*. 2018;9(26):18224-18238.
 169. Orhan A, Gögenur I, Kissow H. The intestinotrophic effects of glucagon-like peptide-2 in relation to intestinal neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(8):2827-2837.
 170. Seguy D, Berthon C, Micol J-B, et al. Enteral feeding and early outcomes of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation following myeloablative conditioning. *Transplantation*. 2006;82(6):835-839.
 171. Azarnoush S, Bruno B, Beghin L, et al. Enteral nutrition: a first option for nutritional support of children following allo-SCT? *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(9):1191-1195.
 172. Seguy D, Duhamel A, Rejeb M Ben, et al. Better outcome of patients undergoing enteral tube feeding after myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2012;94(3):287-294.
 173. Gonzales F, Bruno B, Alarcón Fuentes M, et al. Better early outcome with enteral rather than parenteral nutrition in children undergoing MAC allo-SCT. *Clin Nutr*.

- 2018;37(6):2113-2121.
174. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. 1964;147(3659):747-748.
 175. Geirnaert A, Calatayud M, Grootaert C, et al. Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-14.
 176. Yeung CY, Chan WT, Jiang C Bin, et al. Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. *PLoS One*. 2015;10(9):1-16.
 177. Gerbitz A. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood*. 2004;103(11):4365-4367.
 178. Gorshein E, Wei C, Ambrosy S, et al. Lactobacillus rhamnosus GG probiotic enteric regimen does not appreciably alter the gut microbiome or provide protection against GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant*. 2017;31: e12947.
 179. Cohen SA, Woodfield MC, Boyle N, Stednick Z, Boeckh M, Pergam SA. Incidence and outcomes of bloodstream infections among hematopoietic cell transplant recipients from species commonly reported to be in over-the-counter probiotic formulations. *Transpl Infect Dis*. 2016;18(5):699-705.
 180. Riquelme AJ, Calvo MA, Guzman AM, et al. Saccharomyces cerevisiae Fungemia After Saccharomyces boulardii Treatment in Immunocompromised Patients. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(1):41-43.
 181. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, et al. Treating clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(12):1044-1049.
 182. Kakihana K, Fujioka Y, Suda W, et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*. 2016;128(16):2083-2088.
 183. DeFilipp Z, Peled JU, Li S, et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. *Blood Adv*. 2018;2(7):745-753.
 184. Le Bastard Q, Ward T, Sidiropoulos D, et al. Fecal microbiota transplantation reverses antibiotic and chemotherapy-induced gut dysbiosis in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-11.
 185. Wenzel UA, Magnusson MK, Rydström A, et al. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PLoS One*. 2014;9(6):1-12.
 186. Velcich A, Yang WC, Heyer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science*. 2002;295(5560):1726-1729.
 187. Hickey CA, Kuhn KA, Donermeyer DL, et al. Colitogenic Bacteroides thetaiotaomicron antigens access host immune cells in a sulfatase-dependent

- manner via outer membrane vesicles. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):672-680.
188. Demouveau B, Gouyer V, Gottrand F, Narita T, Desseyn JL. Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018;252:69-82.
 189. Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, et al. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep*. 2015;5:9577.
 190. van Vliet MJ, Tissing WJE, Dun CAJ, et al. Chemotherapy Treatment in Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia Receiving Antimicrobial Prophylaxis Leads to a Relative Increase of Colonization with Potentially Pathogenic Bacteria in the Gut. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):262-270.
 191. van Vliet MJ, Tissing WJE, Rings EHHM, et al. Citrulline as a Marker for Chemotherapy Induced Mucosal Barrier Injury in Pediatric Patients. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:1188-1194.
 192. Zuber J, Radtke I, Pardee TS, et al. Mouse models of human AML accurately predict chemotherapy response. *Genes Dev*. 2009;23(7):877-889.
 193. Wunderlich M, Mizukawa B, Chou F, et al. AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model. *Blood*. 2013;121(12):90-97.
 194. Galloway-Peña JR, Smith DP, Sahasrabhojane P, et al. The role of the gastrointestinal microbiome in infectious complications during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2016;122(14):2186-2196.
 195. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4332-4341.
 196. Harris AC, Ferrara JLM, Braun TM, et al. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood*. 2012;119(12):2960-2963.
 197. Kennedy GA, Varelias A, Vuckovic S, et al. Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: A phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(13):1451-1459.
 198. Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, et al. ST2 as a Marker for Risk of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease and Death. *N Engl J Med*. 2013;369(6):529-539.
 199. McDonald GB, Tabellini L, Storer BE, Lawler RL, Martin PJ, Hansen JA. Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: Predictive value of measurements before GVHD onset and treatment. *Blood*. 2015;126(1):113-120.
 200. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, et al. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight*. 2017;2(3):e89798.

Résumés

La chimiothérapie d'induction et de consolidation suivie d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) constitue le traitement de référence de la plupart des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Ces fortes doses de chimiothérapies sont responsables d'une atteinte de la barrière intestinale à l'origine de complications infectieuses et immunologiques, telles que la réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GvH).

Dans un premier temps l'objectif était d'évaluer au cours d'une étude translationnelle, l'impact et les conséquences de cette chimiothérapie d'induction sur la barrière intestinale. Pour cela, nous avons évalué sur une série de 15 patients atteints de LAM, les paramètres cliniques, biologiques (citrulline plasmatique et acide gras à chaîne courte dans les selles) et microbiologiques (qPCR et séquençages des fèces) avant la chimiothérapie d'induction (T0), pendant la phase d'aplasie (T1) et après la sortie d'aplasie (T2). Tous les patients ont présenté une fièvre et ont nécessité l'administration d'antibiotiques à large spectre après la chimiothérapie. Une septicémie à *E. coli* est survenue chez 26 % d'entre eux. Leur citrulline s'est effondrée à T1 avant de se normaliser progressivement à T2. Il existait une diminution de la diversité α et β à T1 qui persistait à T2 avec une diminution de la plupart de populations bactériennes, exceptées pour les entérobactéries, les entérocoques et les lactobacilles.

Cette chimiothérapie d'induction a ensuite été adaptée pour pouvoir être administrée, sans ajout d'aucun antibiotique, à des souris sauvages (WT) et à des souris transgéniques dont le mucus intestinal est renforcé (Tg222) afin d'évaluer : i. les dommages intestinaux (citrulline plasmatique et analyse des coupes histologiques d'iléon avec marquage de l'apoptose (TUNEL) et de la prolifération cellulaire (PCNA)); ii. le microbiote adhérent iléale (qPCR et séquençage des fragments d'iléon); iii.. la translocation intestinale de *Salmonella* (*S*) Typhimurium administrée par gavage oral. Chez ces souris, la chimiothérapie provoquait une baisse de l'ensemble des lignées sanguines, de la citrulline et une atteinte iléale avec augmentation de l'apoptose, de la prolifération

cellulaire et une baisse du nombre de cellules en gobelets. Trois jours après la fin de la chimiothérapie, on constatait une meilleure réparation tissulaire, avec un taux de citrulline et une diversité α plus élevés chez les souris Tg222 comparé aux souris WT. Les Tg222 étaient également moins sensibles à la translocation intestinale à *S. Typhimurium*.

Dans un second temps, la citrulline plasmatique et la réactivité des macrophages (issus de monocytes circulants) ont été étudiés après stimulation in vitro par différents dérivés microbiens, sur une série de patients, avant que ne soit débuté leur conditionnement d'allo-CSH. Dans cette étude, une citrulline basse et l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages avant la greffe étaient prédictifs de la survenue d'une GvH après la greffe.

Une étude d'une cohorte sur 191 patients a confirmé qu'une citrulline pré-greffe basse ($< 26 \mu\text{mol/l}$) constituait un facteur de risque indépendant de survenue d'une GvH digestive sévère et de mortalité précoce.

Ces différents résultats montrent que la chimiothérapie d'induction est responsable d'une atteinte de la barrière intestinale avec dysbiose favorisant la colonisation, puis la translocation d'agents pathogènes responsables de septicémies. Avant le conditionnement de greffe, une citrulline abaissée et une réactivité des macrophages augmentés témoignent de la persistance de dommages intestinaux infra-cliniques, séquellaires de la chimiothérapie d'induction, qui s'avèrent prédictifs de la survenue d'une GvH aiguë après la greffe. Chez la souris transgénique recevant une chimiothérapie d'induction, le renforcement de l'effet de barrière fait la preuve de son intérêt dans la limitation des dommages intestinaux, de la dysbiose et finalement de la translocation bactérienne.

La préservation et le renforcement de la barrière intestinale des patients atteints de la LAM constituent une approche prometteuse afin de limiter la toxicité de la chimiothérapie d'induction et la survenue d'une GvH aiguë lorsque qu'une allo-CSH doit être réalisée.

Mots clé : Citrulline ; Chimiothérapie ; allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ; barrière intestinale ; microbiote

Impact and consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier in acute myeloid leukemia

Induction chemotherapy with consolidation followed by allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) remains the standard of care in patients with acute myeloid leukemia (AML). But, high dose chemotherapy is responsible for intestinal impairment responsible for complications such as septicemia and Graft vs. Host disease (GvH) after allo-SCT. The aim of this work was to investigate the specific impact and consequences of induction chemotherapy on intestinal barrier in case of AML.

First of all, we investigated on 15 patients with AML, clinical, biological (citrulline and short-chain fatty acid) and microbial (qPCR and sequencing on feces) parameters before induction chemotherapy (T0), during aplasia (T1) and after hematological recovery (T2). An induction chemotherapy model was designed in a mouse model (Wt mice) without antibiotics and in a transgenic model able to release in intestinal lumen a recombinant protein strengthening mucosal layer (Tg222). Intestinal damage was investigated with plasmatic citrulline level, terminal ileum mucosa analysis on histological slides with apoptosis (TUNEL) and cellular proliferation (PCNA) staining. Adherent microflora was assessed with qPCR and sequencing on ileum section. Intestinal translocation was assessed after oral gavage of Salmonella (S). Typhimurium. The fifteen patients had neutropenic fever and received broad-spectrum antibiotics after chemotherapy completion. Septicemia with *E. coli* was diagnosed in 26 % of patients. Plasma citrulline level collapsed at T1 and reached normal value at T2. The alpha and beta diversity decreased significantly and remained low at T2 with a decrease of all bacteria except for *enterobacteria*, *enterococcus* and *lactobacillus*. In mouse model, chemotherapy induced a transient decrease of all blood counts, and citrulline level. We observed also a terminal ileal impairment depicted by the increase of apoptosis and PCNA staining and a decrease of goblet cells. Three days after the chemotherapy completion, we observed a higher tissue repair, citrulline level and a preserved alpha diversity in Tg222 mice compared to Wt mice. Intestinal translocation of S. Typhimurium was also lower than in Wt mice.

Secondly, plasmatic citrulline level and *in vitro* macrophage reactivity were assessed after microbial stimulation with (PAMP) in patients before allo-SCT procedure. Then, the plasma citrulline level as a predictive surrogate marker of GvH was investigated in a large cohort of patients. Before allo-SCT procedure, a low citrulline level and an increase of IL-6 and IL-10 released by macrophages were predictive of GvH. A large study with 191 patients confirmed that a low citrulline level before allo-SCT procedure was an independent risk factor of intestinal GvH.

Intestinal impairment during induction chemotherapy was responsible for a transient epithelial impairment and prolonged dysbiosis leading to bacterial colonization and translocation. Before conditioning regimen, a low citrulline level and increased macrophage reactivity reflect sub-clinical damage and are predictive of GvH after allo-SCT procedure. In mice, mucosal layer strengthening as a proof of concept may enhance tissue repair, maintain microbial diversity and could limit bacterial translocation after high dose chemotherapy.

Key words: Citrulline; Chemotherapy; allogeneic stem cell transplantation; intestinal barrier; microbiota