



**HAL**  
open science

# Maladie du greffon contre l'hôte aigüe (GVHa) : impact des lipopolysaccharides circulants et place du métabolisme des lipoprotéines pour leur neutralisation

Cécile Chagué

## ► To cite this version:

Cécile Chagué. Maladie du greffon contre l'hôte aigüe (GVHa) : impact des lipopolysaccharides circulants et place du métabolisme des lipoprotéines pour leur neutralisation. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCE022 . tel-03201807

**HAL Id: tel-03201807**

**<https://theses.hal.science/tel-03201807v1>**

Submitted on 19 Apr 2021

**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.

## **THÈSE DE DOCTORAT**

**DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ**

Préparée à l'UMR1098 RIGHT Interactions Hôte-Greffon-Tumeur, Ingénierie cellulaire et génique

École doctorale n°554 – Environnements-Santé

Doctorat de Biologie Cellulaire

# **Maladie du greffon contre l'hôte aigüe (GVHa) : impact des lipopolysaccharides circulants et place du métabolisme des lipoprotéines pour leur neutralisation**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 16 décembre 2019

par

**Cécile Chagué**

Composition du Jury :

Pr. Marie-Thérèse Rubio	CHRU, UMR 7365, Nancy	Rapporteur, Présidente du jury
Dr. Maryse Guerin	UMRS 1166, Paris	Rapporteur
Dr. Béatrice Gaugler	UMRS 938, Paris	Examineur
Dr. Thomas Gautier	UMR1241, Dijon	Examineur
Pr. Philippe Saas	UMR1098, Besançon	Directeur de thèse
Dr. Etienne Daguindau	CHRU, UMR1098, Besançon	Directeur de thèse

# Remerciements

*J'exprime mes plus sincères remerciements à Mesdames le Professeur Marie-Thérèse Rubio et le Docteur Maryse Guerin pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps que vous avez consacré à sa lecture et son évaluation.*

*Je remercie chaleureusement Madame le Docteur Béatrice Gaugler et Monsieur le Docteur Thomas Gautier pour avoir accepté d'examiner ces travaux, pour votre accompagnement et vos conseils tout au long de ma thèse.*

*Merci au Professeur Philippe Saas pour m'avoir accueilli et accordé votre confiance dès mon premier stage de Master. Je vous remercie pour vos conseils, vos encouragements, votre soutien et votre bienveillance. Votre expertise scientifique et votre connaissance quasiment illimitée de la littérature forcent l'admiration et sont une vraie source de motivation. Enfin, merci pour la grande humanité dont vous avez toujours fait preuve à mon égard.*

*Merci au Docteur Etienne Daguindau pour ta disponibilité et ton enthousiasme qui ont permis d'initier cette nouvelle thématique au laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir l'aspect clinique de la recherche translationnelle. Je te remercie pour ton soutien et ton optimisme.*

*Je tiens à remercier sincèrement tous les membres du jury pour la riche discussion qui a suivi ma soutenance grâce à votre présence ou vos commentaires.*

*J'adresse tous mes remerciements aux personnes qui ont collaboré à ces travaux :*

*Aux membres de l'UMR1231 de Dijon. Merci aux Docteurs Laurent Lagrost, Thomas Gautier, Jean-Paul Pais de Barros, Valérie Deckert et David Masson pour l'énergie et le soutien que vous avez apporté lors du démarrage et du développement du projet. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions et d'avoir accepté de me transmettre vos connaissances sur le LPS et les lipoprotéines. Je remercie également Naig le Guern, Hélène Choubley et Emilie Charron pour leur aide et leur sympathie lors de mes visites dijonnaises.*

*Au Professeur Didier Hocquet et à Juliette Branget pour avoir mis à ma disposition leur expertise du monde bactérien et leur aide technique.*

*Au Professeur Séverine Valmary-Dégano et au Service d'anatomopathologie du CHU de Besançon pour la préparation et l'analyse des coupes histologiques.*

*Merci aux membres de l'UMR1098 avec qui j'ai pu échanger au cours de mes stages de Master et de ma thèse :*

*Merci au Docteur Sylvain Perruche pour le dynamisme de l'équipe ATI et au Professeur Olivier Adotevi pour ses retours enthousiastes sur mon travail.*

*Merci Sarah, Sabeha, Anne, Clémence et Afag pour votre accueil et votre aide lors de mon arrivée en M1. Merci Adam, même si tu malmènes tes stagiaires, c'est pour la bonne cause ! Merci de m'avoir initié à la curiosité et au dynamisme scientifique, et aussi à un peu de culot quand c'est nécessaire !*

*Merci Sandra et Blandine, mes petites stagiaires préférées. Ça a été très enrichissant mais aussi très plaisant de travailler avec vous. Je vous souhaite le meilleur pour la suite !*

*Enfin, évidemment, un grand merci à toute la « team IBCT » qui rend le travail plus léger au milieu de nos vieux murs gris :*

*Myriam et Alphonsine pour votre calme quant à ces commandes qui ne passent jamais du premier coup et, surtout, pour votre bonne humeur. Francis pour ton aide avec les souris et, surtout, pour tes petites bougonneries ! Mélanie pour ta gentillesse, les plannings de ménage colorés et tes talents culinaires. Séverine pour ta fraîcheur et ton franc-parler. Anna, pour ton aide et pour tes inventions insolites. Si on ne t'avait pas, c'est toi qu'il faudrait inventer ! François pour les petites chansons qui sentent la noisette et tout le reste. Charline pour ta « normalité », nos réunions de crise salutaires... et tout le reste ! Thierry et Omayra, merci d'avoir été des modèles d'enthousiasme et de rigueur scientifiques (je ne préciserai pas qui est qui !) et surtout, des colocataires de bureaux en or. Mélissa pour ta gentillesse et pour n'avoir pas eu peur de nous rejoindre dans le bureau en pleine période de rédaction. Ne t'inquiète pas, tu vas réussir à percer le secret de la reprogrammation des macrophages !*

*La liste ne serait pas complète sans mes collègues et désormais amies. Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous et je suis tellement reconnaissante que nos chemins se soient croisés. Merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles et d'avoir partagé avec moi les moments de joie (et d'avoir supporté mes larmes dans une situation comme dans l'autre... héhé).*

*Merci Inès pour ton grain de folie et ta sensibilité. Je dois dire que ton bizutage et ses dommages collatéraux restent un particulièrement bon souvenir ! C'est ton goût du voyage qui nous a emmené dans ce chouette London trip. Quand est-ce qu'on recommence ?*

*Hanane, merci de me supporter depuis la Licence... Tu as la palme d'or binôme. Merci pour ta douceur, ta gentillesse et tes petits gâteaux (les tartelettes choco-caramel !). Je te souhaite le meilleur dans les grandes aventures qui t'attendent et j'espère que tu traverseras les montagnes de temps en temps pour venir nous voir.*

*Anaïs et Audrey... Je ne sais pas par qui commencer... Aller, dans un souci d'égalité (hihi), je prends l'ordre alphabétique ! Merci Anaïs pour ton naturel, ta sincérité et ta grande humanité. Ces trois années ont été ponctuées de moments difficiles mais aussi et surtout de petites victoires et de très bons moments que j'ai adoré partager avec toi. J'espère que tu trouveras la reconnaissance et l'empathie que tu mérites où le vent te portera (si possible au soleil et avec une petite place pour moi, merci :) !*

*Merci Audrey pour ta gentillesse, ta prévenance et ta perspicacité. Même si on t'a embêté bien longtemps avec ton statut de petite nouvelle, tu as vite su faire ta place et te rendre indispensable. Tu es un vrai modèle de détermination et de courage et puis, qu'est-ce qu'on rigole quand tu veux bien « faire la night » :D Je suis ravie de partager encore un petit bout de route et de bureau avec toi !*

*Enfin, je remercie ma famille, ma belle-famille (bon courage les grumeaux qui êtes assez fous pour vous lancer dans une thèse à votre tour !) et mes amis et copains de m'avoir soutenue et de m'avoir changé les idées sans jamais oublier de me rappeler mon devoir (« bon et cette thèse, quand est-ce que tu la finis ? ») ! Merci d'avoir été présents si nombreux pour ma soutenance, je me suis sentie particulièrement bien entourée.*

*Merci à mes petits parents pour tout leur soutien et leur amour. Je sais que cette thèse a été un drôle de moment pour vous aussi, mais j'espère que vous serez fiers de votre savant fou ! Merci pour tout, depuis tout ce temps. Je vous aime.*

*Rémi, mon doudou, mon amour. Merci d'avoir cru en moi tellement fort que j'y ai un peu cru moi-même. Tout ça n'aurait pas été possible sans toi, et c'est sûr, la vie serait moins facile et moins colorée sans toi à mes côtés. Merci pour ces neuf magnifiques années et pour toutes les prochaines aventures. Je t'aime.*

*Enfin, je ne remercie pas la touche E de mon clavier qui m'a lâchement abandonné en pleine rédaction...*

## Résumé

La maladie du greffon contre l'hôte aigüe (GVHa) est une complication majeure de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (alloCH) associée à une mortalité et une morbidité importantes. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des signaux de danger impliqués dans l'activation des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'entretien des lésions épithéliales intestinales. Dans ce contexte, rompre la cascade inflammatoire initiée par les LPS semble être une approche originale pour prévenir le développement de la GVHa. Ainsi, notre groupe se propose d'évaluer l'impact du *Reverse LPS Transport* (RLT) dans la physiopathologie de la GVH. Le RLT est une voie analogue au transport inverse du cholestérol qui correspond au transfert de molécules lipophiles vers les lipoprotéines de haute densité (HDL) pour leur élimination biliaire.

En utilisant des modèles expérimentaux de GVHa, nous avons confirmé l'exposition aux LPS des souris receveuses par une technique basée sur la spectrométrie de masse. Nous avons ensuite exploré l'impact du RLT en modulant plusieurs effecteurs ou régulateurs potentiels. Nos principaux résultats montrent que :

- i) En absence totale de HDL (c.-à-d. des souris *ApoA1<sup>tm1Unc</sup> knock-out*), la mortalité et la sévérité de la GVHa sont augmentées chez les souris receveuses. Cette aggravation est associée à une accélération de la maturation des APC et une élévation des réponses lymphocytaires de type 1 dans la rate et le foie.
- ii) La concentration de HDL est effondrée dans le plasma des souris allogreffées, mais elle peut être corrigée par l'administration répétée de HDL isolées à partir de plasma humain. La restauration du taux de HDL circulantes permet d'améliorer significativement la survie et le score clinique des souris transplantées. De plus, l'administration de HDL réduit la concentration de LPS plasmatique et biliaire, la capacité des splénocytes à activer des lymphocytes T allogéniques et la production de cytokines pro-inflammatoires par les APC hépatiques.

L'ensemble de ces données suggère que l'administration de HDL pourrait être une stratégie prophylactique pour prévenir la GVHa.

**Mots-clés** : allogreffe de cellules hématopoïétiques, maladie du greffon contre l'hôte aigüe, lipopolysaccharides, lipoprotéines de haute densité, transport inverse

## Abstract

Acute Graft-versus-Host Disease (aGVHD) remains an important cause of mortality and morbidity after allogeneic hematopoietic cell transplantation (AHCT). Lipopolysaccharides (LPS) are described as critical triggers of antigen-presenting cell (APC) priming, cytokine release and intestinal mucosal damage sustainment. We hypothesize that modulating the reverse LPS transport (RLT) is a potential approach to mitigate aGVHD through the disruption of the inflammatory cascade initiated by LPS signaling. The RLT is a counterpart of reverse cholesterol transport in which lipophilic substances are integrated into high-density lipoproteins (HDL) for liver clearance.

Using validated AHCT mouse models, we have confirmed the systemic LPS exposure by an innovative technique based on high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry and investigated the role of RLT by modulating several effectors or potential regulators. Our major findings show that:

- i)* In the complete absence of circulating HDL (*i.e.* in *ApoA1<sup>tm1Unc</sup>* knock-out mice), recipient mice experienced a more severe GVHD associated with an increased APC maturation and type 1 T cell responses in the spleen and the liver.
- ii)* The level of circulating HDL is collapsed in GVHD mice but could be corrected by repeated intravenous infusion of HDL isolated from human plasma. The restoration of HDL pool leads to an increased survival and a decreased GVHD severity. Furthermore, HDL infusion reduces the concentration of circulating and biliary LPS, the capacity of splenocytes to sustain alloreactive responses and the production of pro-inflammatory cytokines by liver APC (namely, Küpffer cells and non-resident macrophages).

Taken together, these results suggest that HDL infusion may be a potential prophylactic approach for aGVHD.

**Keywords:** hematopoietic cell transplantation, acute graft-versus-host disease, lipopolysaccharides, lipid metabolism, high-density lipoproteins, reverse transport

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>13</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>14</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>19</b>
<b>I. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques</b> .....	<b>19</b>
2. Indications .....	20
3. Procédure.....	20
4. Complications de l'allogreffe.....	23
<b>II. La maladie du greffon contre l'hôte aigüe (GVHa)</b> .....	<b>26</b>
1. Définition.....	26
2. Épidémiologies .....	27
3. Physiopathologie .....	27
4. Prophylaxie.....	33
5. Traitement .....	34
6. Modèles expérimentaux de GVH aigüe.....	36
<b>III. Microbiote et perméabilité intestinale au cours de la GVH aigüe</b> .....	<b>39</b>
1. La barrière intestinale : organisation et immunité.....	39
2. Composition et diversité du microbiote chez le sujet sain .....	46
3. Perturbations de l'homéostasie intestinale au cours de la GVHa.....	47
<b>IV. Les lipopolysaccharides (LPS), signaux initiateurs de la GVH aigüe</b> .....	<b>52</b>
1. Structure et propriétés des LPS .....	52
2. Techniques de quantification des LPS .....	55
3. Détection des LPS et activation de la réponse immunitaire .....	57
4. LPS et GVHa .....	61
<b>V. Inactivation et élimination des LPS circulants</b> .....	<b>63</b>
1. Métabolisme des lipoprotéines circulantes.....	63
2. Neutralisation par le transport inverse des LPS .....	67
3. Clairance hépatobiliaire des LPS .....	71
<b>Objectifs</b> .....	<b>73</b>



<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>77</b>
I. Modèles expérimentaux de GVHa .....	77
II. Modalités de traitement des souris .....	79
III. Dosages et expérimentations <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	80
IV. Représentation et analyse statistique des résultats .....	83
<b>Résultats .....</b>	<b>87</b>
I. Étude du métabolisme des LPS dans un modèle murin de GVHa .....	87
II. Modulation des effecteurs du transport inverse des LPS.....	95
III. L'administration de HDL comme approche prophylactique de la GVHa .....	107
IV. Résultats préliminaires.....	115
<b>Discussion et Conclusion.....</b>	<b>123</b>
I. Discussion des principaux résultats.....	123
1. Étude du métabolisme des LPS dans un modèle murin de GVHa.....	123
2. Modulation des effecteurs du transport inverse des LPS .....	124
3. L'administration de HDL comme approche prophylactique de la GVHa .....	128
4. Résultats préliminaires .....	132
5. Différences du métabolisme lipidique murin et humain .....	134
II. Perspectives .....	136
1. Alternatives pour augmenter le taux de HDL circulantes .....	136
2. Effet GVL ? .....	138
3. Lésions hépatiques de la GVHa : rôles sur les transporteurs hépatiques du cholestérol/des LPS ? .....	138
4. Exploration des liens entre LPS, IL-22 et ILC.....	139
III. Conclusion générale.....	140
<b>Bibliographie.....</b>	<b>145</b>
<b>Annexe 1 – Demande de brevet .....</b>	<b>163</b>

## Table des illustrations

<b>Figure A</b> – Le nombre annuel d’alloCH réalisées est en constante augmentation en Europe .....	19
<b>Figure B</b> – Les principales indications de l’alloCH en Europe en 2017 .....	20
<b>Figure C</b> – Les principales causes de décès des patients allogreffés (donneur non apparenté) .....	24
<b>Figure D</b> – Physiopathologie de la GVH aiguë d’après Ferrara et <i>al.</i> .....	28
<b>Figure E</b> – L’épithélium intestinal possède une structure en cryptes/villosités .....	40
<b>Figure F</b> – Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés sont organisés autour des cellules M .....	42
<b>Figure G</b> – L’homéostasie intestinale est maintenue grâce à une communication fine et dynamique .....	45
<b>Figure H</b> – Des évènements précoces (gauche) et tardifs (droite) au sein du tube digestif participent à la physiopathologie de la GVHa .....	47
<b>Figure I</b> – La structure générale des LPS se compose d’un lipide et d’une chaîne oligosaccharidique .....	52
<b>Figure J</b> – Le lipide A du LPS d’ <i>E. coli</i> correspond à un disaccharide de glucosamines hexaacylées .....	53
<b>Figure K</b> – La liaison des LPS sur leur récepteur spécifique TLR4 se déroule en trois étapes .....	59
<b>Figure L</b> – La structure générale des lipoprotéines s’organise autour d’une apolipoprotéine .....	64
<b>Figure M</b> – La voie (simplifiée) de transport inverse du cholestérol (RCT) .....	67
<b>Figure N</b> – Les LPS circulants peuvent être pris en charge par deux voies antagonistes et interconnectées .....	70
<b>Figure O</b> – Les HDL et APOA-I exercent des effets spécifiques sur les cellules de l’immunité innée et adaptative .....	130
<b>Figure P</b> – Vue d’ensemble des résultats obtenus dans des modèles expérimentaux de GVHa .....	141

# Abréviations

<b>3HM</b>	3-hydroxymyristate	<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>ABC#</b>	<i>ATP Binding Cassette #</i> (transporters)	<b>IL-#</b>	Interleukine-#
<b>Allo</b>	Allogénique	<b>ILC</b>	<i>Innate lymphoid cells</i>
<b>AlloCH</b>	Allogreffe de cellules hématopoïétiques	<b>ILF</b>	Follicule lymphoïde isolé
<b>AMP</b>	Peptide anti-microbien	<b>KC</b>	Cellule de Küpffer
<b>AOAH</b>	Acyloxyacyl hydrolase	<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>APOA-I</b>	Apolipoprotéine A-I	<b>LAL</b>	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
<b>APRIL</b>	<i>A proliferation inducing ligand</i>	<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>LBP</b>	<i>LPS binding protein</i>
<b>BAFF</b>	<i>B cell activating factor</i>	<b>LCAT</b>	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
<b>BPI</b>	<i>Bactericidal permeability increasing protein</i>	<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>CD#</b>	<i>Cluster of differenciation #</i>	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide(s)
<b>CETP</b>	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>	<b>LT</b>	Lymphocytes T
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>LT/LBP</b>	<i>Lipid transfer/lipopolysaccharide binding proteins</i>
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices de l'antigène	<b>LTreg(s)</b>	Lymphocyte(s) T régulateur(s)
<b>CSH</b>	Cellules souches hématopoïétiques	<b>MDSC</b>	Cellules myéloïdes suppressives
<b>CTL</b>	Lymphocyte T cytotoxique	<b>miHA</b>	Antigènes mineurs d'histocompatibilité <i>Mesenteric lymph node</i> pour Ganglions lymphatiques mésentériques
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>	<b>MLN</b>	
<b>DC</b>	Cellule dendritique	<b>MLR</b>	Réaction lymphocytaire mixte
<b>FMT</b>	Transplantation de microbiote fécal	<b>MO</b>	Moelle osseuse
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>	<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor-κB</i>
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> ( <i>Acute</i> ) <i>graft-versus-host disease</i>	<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>GVH(a)</b>	pour Maladie du greffon contre l'hôte (aiguë)	<b>NLRP</b>	<i>NOD-, LRR-, and pyrin domain- containing</i>
<b>GVL</b>	<i>Graft-versus-leukemia</i>	<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>	<b>NRM</b>	Macrophages non-résidents <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i>	<b>PAMP</b>	
<b>HMGB1</b>	<i>High-mobility group box 1</i>	<b>PBMC</b>	pour Cellules mononuclées du sang périphérique
<b>ICT</b>	Irradiation corporelle totale	<b>PLTP</b>	<i>Phospholipid transfer protein</i>
<b>IDL</b>	<i>Intermediate density lipoprotein</i>	<b>PP</b>	Plaque de Peyer
<b>IEC</b>	Cellule épithéliale intestinale	<b>PPAR-α</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
<b>IFN-γ</b>	Interféron-γ		

<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>	<b>ST2</b>	<i>Suppressor of tumorigenicity 2</i>
<b>RCT</b>	<i>Reverse cholesterol transport pour</i> Transport inverse du cholestérol	<b>Syng</b>	Syngénique
<b>REG-3a/γ</b>	<i>Regenerating islet-derived-3a/γ</i>	<b>Tc1</b>	(Lymphocyte) <i>T cytotoxic type 1</i>
<b>RLT</b>	<i>Reverse LPS transport (pour</i> Transport inverse des LPS)	<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species pour</i> Espèces réactives de l'oxygène	<b>Th1</b>	(Lymphocyte) <i>T helper type 1</i>
<b>SCFA</b>	<i>Short-chain fatty acids</i> pour Acides gras à chaîne courte	<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>SMP</b>	Syndrome myeloprolifératif	<b>TNF-α</b>	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
<b>SR-BI</b>	<i>Scavenger receptor class B type 1</i>	<b>UDCA</b>	Acide ursodésoxycholique
		<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i>
		<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

# Introduction

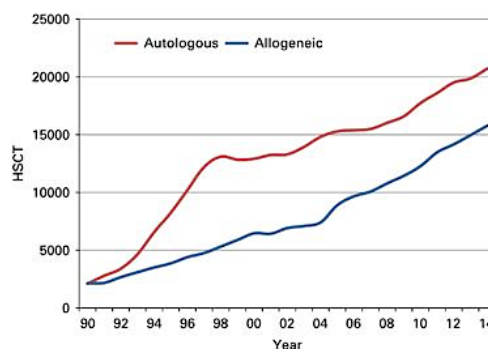
# Introduction

## I. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques

### 1. Principe

L'allogreffe de cellules hématopoïétiques (alloCH) est une approche thérapeutique puissante qui vise à supprimer le système hématopoïétique d'un patient atteint d'hémopathie maligne et à le remplacer par un système complet reconstitué à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) d'un donneur sain. Le principe thérapeutique anti-leucémique de l'alloCH repose sur le concept d'alloréactivité permettant l'élimination des cellules cancéreuses résiduelles par les cellules immunocompétentes du donneur. On parle alors d'effet « *graft versus leukemia* » (GVL) ou « *graft versus tumor* ». L'alloCH est toujours précédée par un traitement qui vise à assurer la prise de greffe. Cette procédure est appelée conditionnement et combine une ou plusieurs molécules de chimiothérapie et/ou de la radiothérapie.

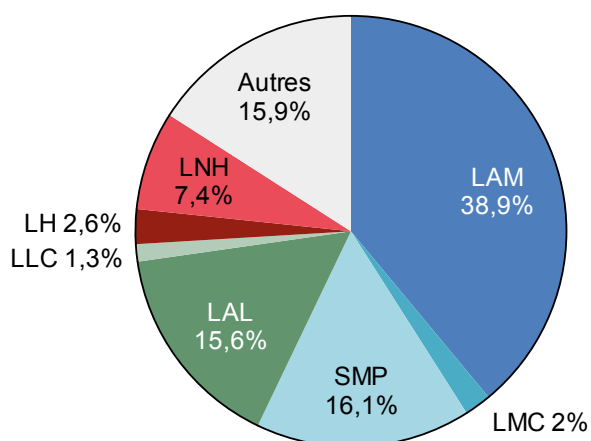
Le perfectionnement des pratiques cliniques ainsi que l'apport de la recherche fondamentale ont permis d'étendre les indications et l'accès à l'alloCH (donneurs alternatifs, prévention et traitement des complications immunologiques...). Ainsi, le nombre de transplantations n'a cessé d'augmenter depuis les années 1980 et atteint en 2017 plus de 18 000 allogreffes annuelles dans les centres européens (**Figure A**) (1) dont un peu moins de 2000 dans les centres français (2).



**Figure A** – Le nombre annuel d'alloCH réalisées est en constante augmentation en Europe.  
Source : Passweg et al., 2017 (3)

## 2. Indications

Les principales applications de l'alloCH concernent les hémopathies malignes à fort risque de rechute. D'après l'étude du registre de l'*European society for Blood and Marrow Transplantation* (1), l'indication majeure reste la leucémie aiguë myéloïde (38,9% des alloCH européennes en 2017), suivie par les syndromes myéloprolifératifs (16,1%) et la leucémie aiguë lymphoblastique (15,6%). Dans de plus rares cas, l'alloCH peut être indiquée dans les lymphomes (10%), les leucémies chroniques (3,3%), les insuffisances médullaires (4,7%) ou les hémoglobinopathies (3,7%) (Figure B).



**Figure B – Les principales indications de l'alloCH en Europe en 2017** étaient les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Les lymphomes de Hodgkin (LH), les lymphomes non-hodgkiniens (LNH), les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) représentent des indications plus rares. Adapté de : Rapport d'activité de l'*European society for Blood and Marrow Transplantation* – Passweg et al., 2019 (1)

## 3. Procédure

### a. Sources de cellules hématopoïétiques

Les cellules hématopoïétiques greffées sont issues d'un donneur sain et peuvent provenir de trois sources :

- la moelle osseuse (24,2% des alloCH en France en 2017 (2))
- les cellules souches périphériques mobilisées par du *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) (71,8%)
- le sang placentaire ou « sang de cordon » (4%)

Le type de greffon est choisi en fonction de plusieurs paramètres : la faisabilité du prélèvement chez le donneur, le statut de la maladie du receveur, leurs poids, le type de conditionnement...

Le donneur est quant à lui choisi pour son histocompatibilité avec le receveur, c'est à dire l'homologie de son complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Une identité pour les deux allèles des gènes HLA (*Human Leucocyte Antigen*) de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) et de classe II (HLA-DR, HLA-DQ – identité de 10/10 – et éventuellement HLA-DP – identité de 12/12) vise à restreindre la réaction allogénique à la reconnaissance des autres molécules HLA non compatibles **(4)** et des antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA) **(5)**. Les miHA sont des peptides présentés par les molécules du CMH et codés par des gènes pour lesquels il existe un polymorphisme allélique.

Les donneurs sont recherchés dans la famille du patient en premier lieu. Au sein d'une fratrie, deux membres ont 25% de chance d'avoir reçu les mêmes allèles transmis « en bloc » par leurs parents. On parle alors de greffe géno-identique (compatibilité de 12/12). Si un tel donneur n'est pas disponible, un donneur non-apparenté phéno-identique (compatibilité de 10/10) sera recherché dans le registre mondial des donneurs volontaires (*World Marrow Donor Association*). Dans certains cas, une moindre compatibilité peut être acceptée : le donneur et le receveur présentent une ou plusieurs différences (on parle de disparité ou « *mismatch* ») de leurs allèles HLA. On distingue les donneurs haplo-identiques et les donneurs dits *mismatch*. Les donneurs haplo-identiques possèdent un seul haplotype HLA en commun avec le receveur (en général, il s'agit d'un ascendant ou descendant de celui-ci). Les donneurs dits *mismatch* sont le plus souvent non-apparentés et présentent une compatibilité de 9/10. D'autres critères sont également pris en compte pour une sélection optimale tels que l'âge, le sexe, le groupe sanguin ABO, le statut sérologique *cytomegalovirus* (CMV), le poids et les comorbidités du donneur.

Ainsi en France, en 2017, les greffes apparentées HLA-identiques représentaient 27,4% des alloCH, les greffes non apparentées 52,4% (dont 3,9% de sang placentaire) et les greffes apparentées avec disparité HLA 19,8% **(2)**.



### **b. Conditionnement du receveur**

L'injection des cellules hématopoïétiques du donneur est précédée d'une étape de conditionnement par chimio- et/ou radiothérapie. L'objectif est d'induire une immunosuppression chez le receveur pour prévenir le rejet du greffon et de libérer tout ou partie de la niche hématopoïétique afin de favoriser la prise de greffe.

Les protocoles de conditionnement sont nombreux et adaptés au receveur et à sa pathologie. Historiquement, les conditionnements étaient tous myéloablatifs et reposaient sur de fortes doses de chimiothérapie (agents alkylants tels que cyclophosphamide et/ou busulfan) accompagnées éventuellement d'une irradiation corporelle totale (ICT). Toutefois, ce type de protocole induit une forte toxicité sur les organes sains, limitant son utilisation aux receveurs les plus jeunes. Les conditionnements à intensité réduite et les conditionnements non-myéloablatifs ont été développés au cours des vingt dernières années pour étendre les indications d'allogreffe, notamment aux receveurs plus âgés. Ces protocoles reposent sur l'utilisation de plus faibles doses d'agents alkylants en association avec des drogues immunosuppressives (par exemple les analogues de purine comme la fludarabine), du sérum anti-lymphocytaire et/ou de plus faibles doses d'ICT **(6)**.

### **c. Prise de greffe et chimérisme**

Très précocement après la greffe, les CSH rejoignent le compartiment médullaire, mais leur activité d'hématopoïèse et le retour à un nombre physiologique de cellules circulantes sont des processus plus lents. La cinétique de repopulation est différente selon les types cellulaires. Elle est de l'ordre de quelques semaines après greffe pour les cellules de l'immunité innée (monocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules *Natural Killer* [NK]) mais peut prendre plusieurs mois à plusieurs années pour les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B, lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, lymphocytes T CD8<sup>+</sup>). Le répertoire T peut être reconstitué à partir de deux sources : (i) l'expansion périphérique de lymphocytes T (LT) naïfs et mémoires contenus dans le greffon et (ii) la génération *de novo* à partir de progéniteurs hématopoïétiques du donneur. La production de nouveaux LT naïfs est plus longue car les précurseurs doivent passer les étapes d'ontogénie et d'éducation dans le thymus allogénique **(7)**.

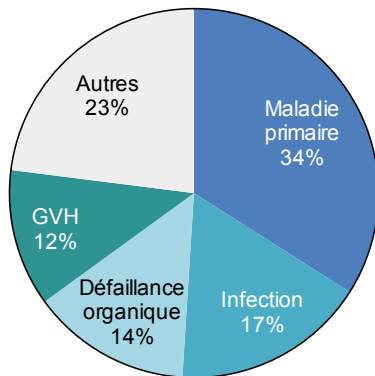
Cette repopulation du compartiment hématopoïétique conduit à un chimérisme post-greffe, c'est-à-dire à la coexistence chez un même individu de lignées cellulaires d'origines génétiques différentes. Si les cellules du donneur représentent au moins 95% des cellules sanguines ou médullaires analysées, on parle de chimérisme total ou complet, en deçà, il s'agit d'un chimérisme mixte ou partiel. L'analyse du chimérisme après greffe est un outil important pour évaluer la prise de greffe et le risque de rechute du patient, et ainsi orienter les décisions thérapeutiques **(8)**.

#### 4. Complications de l'allogreffe

L'alloCH est un traitement puissant associé à des effets indésirables graves tels que *i)* la rechute de la maladie primaire liée à un effet GVL insuffisant, *ii)* les infections favorisées par un défaut de reconstitution immunitaire, *iii)* la toxicité directe du conditionnement et des traitements immunosuppresseurs sur les organes ou *iv)* les conflits immunologiques entre les cellules immunocompétentes du greffon et les cellules saines du receveur.

Tout d'abord, le conditionnement pré-greffe induit le plus souvent une aplasie profonde. L'anémie et la thrombopénie peuvent être corrigées par des transfusions mais il n'existe pas de moyen de pallier la leucopénie. Malgré des précautions importantes (chambres à flux laminaires, traitements prophylactiques...), les déficits de phagocytose (neutropénie), d'immunité humorale (hypo/asplénisme, hypogammaglobulinémie) et d'immunité cellulaire (lympho/monocytopénie, réduction du répertoire lymphocytaire T) augmentent durablement le risque infectieux, au-delà de la seule période d'aplasie. Les infections représentent aujourd'hui la deuxième cause de mortalité des patients allogreffés, après la rechute de la pathologie primaire **(9) (Figure C)**. Miller et son équipe ont déterminé dans une étude rétrospective nord-américaine que 70% des patients développent une infection bactérienne dans la première année post-greffe et 33% de ces infections présentent un risque vital ou sont fatales pour le receveur **(10)**. Les principaux agents infectieux bactériens rencontrés sont des entérobactéries, des streptocoques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile* ou encore *Staphylococcus aureus*. Les infections peuvent également être

d'origine fongique (candidose, aspergillose, pneumocystose, mucormycose...), virale (herpèsvirus, adénovirus, influenza virus...) ou parasitaire (toxoplasmose...) **(11)**.



**Figure C – Les principales causes de décès des patients allogreffés (donneur non apparenté) dans les trois premières années post-greffe sont la rechute de la maladie primaire, les infections, la défaillance organique et la maladie du greffon contre l'hôte (GVH).** Adapté de : *Summary Slides of the Center for International Blood and Marrow Transplant Research, 2018 (9)*

Par ailleurs, le conditionnement, selon son intensité et les comorbidités du receveur, peut provoquer des lésions organiques plus ou moins graves et réversibles. Ces atteintes peuvent notamment concerner l'appareil urinaire (insuffisance rénale aiguë ou chronique, cystite hémorragique...), le foie (syndrome d'obstruction sinusoidale...), le cœur (insuffisance cardiaque, coronopathie...), le tube digestif et/ou le système endocrinien (dysthyroïdie, diabète, syndrome métabolique...). L'insuffisance rénale chronique affecte environ 15% des patients allogreffés et est majoritairement causée par les traitements immunosuppresseurs (inhibiteurs de calcineurine) et/ou l'ICT **(12)**. Les atteintes hépatiques touchent quant à elles environ 80% des transplantés et sont souvent détectées lors de l'apparition d'un ictère. Le conditionnement pré-greffe est à l'origine de lésions des vaisseaux sinusoides provoquant l'obstruction progressive des veines centrolobulaires du foie (maladie veino-occlusive), un dysfonctionnement hépatique voire des nécroses hémorragiques. Les complications hépatiques peuvent aussi comprendre les hépatotoxicités médicamenteuses, les réactivations des virus *herpès simplex* et de l'hépatite B ou la maladie du greffon contre l'hôte **(13)**.

La maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour *graft-versus-host disease*) est la troisième grande cause de mortalité non associée à la rechute. La GVH est la réaction immunologique des cellules du donneur contre les tissus sains du receveur. Historiquement, on distinguait une forme aiguë et une forme chronique en fonction du délai d'apparition des signes cliniques (avant ou après le 100<sup>e</sup> jour post-greffe). Toutefois, le développement des conditionnements à intensité réduite a mis en lumière des GVH aiguës d'apparition tardive et la notion d'*overlap syndrom* (coexistence des

formes aiguë et chronique) qui remettent en cause la classification de la GVH sur son seul délai d'apparition. Aujourd'hui, les avancées dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'alloCH ont permis de préciser la sémiologie et la cinétique de ces deux formes. Par exemple, les lésions histologiques spécifiques sont classiquement inflammatoires pour la GVH aiguë et fibrosantes pour la GVH chronique **(14)**.

## II. La maladie du greffon contre l'hôte aiguë (GVHa)

### 1. Définition

La GVH est une complication fréquente et grave de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques. Elle est le versant néfaste de l'effet GVL et est associée à une mortalité et une morbidité importantes. La GVH correspond à la réaction des cellules immunocompétentes présentes dans le greffon contre les tissus du receveur suite à des réactions inflammatoires en cascade initiées majoritairement lors du conditionnement.

Ce travail porte exclusivement sur la forme aiguë de la GVH dont les signes cliniques sont principalement cutanés (81% des patients), gastro-intestinaux (54%) et hépatiques (50%) (15). Chez l'homme, la sévérité de la pathologie est évaluée pour chaque organe, puis gradée en GVHa modérée (grades I-II) ou sévère (grades III-IV) selon la classification de Glucksberg modifiée (16) ou les critères standardisés MAGIC (*Mount Sinai Acute GVHD International Consortium*) (17) (Tables A et B).

<b>A</b>	<b>Peau</b>	<b>Foie</b>	<b>Tube digestif</b>
Critère	Étendue du rash maculo-papuleux (% de surface corporelle)	Bilirubinémie (µmol/L)	Volume journalier de selles (mL)
Stade 1	< 25%	34 à 50	> 500
Stade 2	25 à 50%	51 à 102	> 1000
Stade 3	> 50%	103 à 255	> 1500
Stade 4	Généralisée avec formation de bulles et desquamation	> 255	> 2000 ou douleur abdominale sévère accompagnée ou non d'un iléus

<b>B</b>	<b>Critères de Glucksberg modifiés</b>	<b>Critères MAGIC</b>
Grade I	Peau = 1 ou 2 (absence de GVH hépatique ou digestive)	
Grade II	Peau = 1 à 3 et/ou Foie = 1 et/ou Tube digestif = 1, altération légère de l'état général	Peau = 1 à 3 et/ou Foie = 1 et/ou Tube digestif = 1
Grade III	Foie = 1 à 4, Peau et/ou Tube digestif = 1 à 3, altération marquée de l'état général	Foie = 2 à 3 et/ou Tube digestif = 2 à 3
Grade IV	Peau et/ou Tube digestif = 4, altération sévère de l'état général	Peau = 4 et/ou Foie = 4 et/ou Tube digestif = 4

**Tables A et B – Le système de gradation de la sévérité de la GVHa chez l'homme (B) est basé sur l'évaluation de l'atteinte de chaque organe cible (A).** Adapté de : Przepiorka et al., 1994 (16) et Harris et al., 2016 (17)

## 2. Épidémiologies

Les statistiques concernant la GVH aiguë varient entre les différents centres de greffe (subjectivité de l'appréciation, hétérogénéité des pratiques de greffe). On estime qu'environ 30 à 50 % des patients allogreffés développent une GVHa (grades I-IV) et 14% une forme sévère (grade III-IV) **(18)**.

L'incidence de la GVHa est étroitement corrélée au degré de disparité HLA entre le donneur et le receveur, ainsi qu'aux disparités des miHA. Toutefois, d'autres facteurs sont significativement associés à sa survenue tels que les caractéristiques du donneur (âge, sexe, allo-immunisation préalable) et du receveur (âge, maladie primaire), le type de greffon (risque accru avec l'utilisation de cellules souches périphériques) ou le type de conditionnement (l'incidence augmente avec l'intensité de conditionnement) **(19)**.

## 3. Physiopathologie

### a. Postulats de Billingham

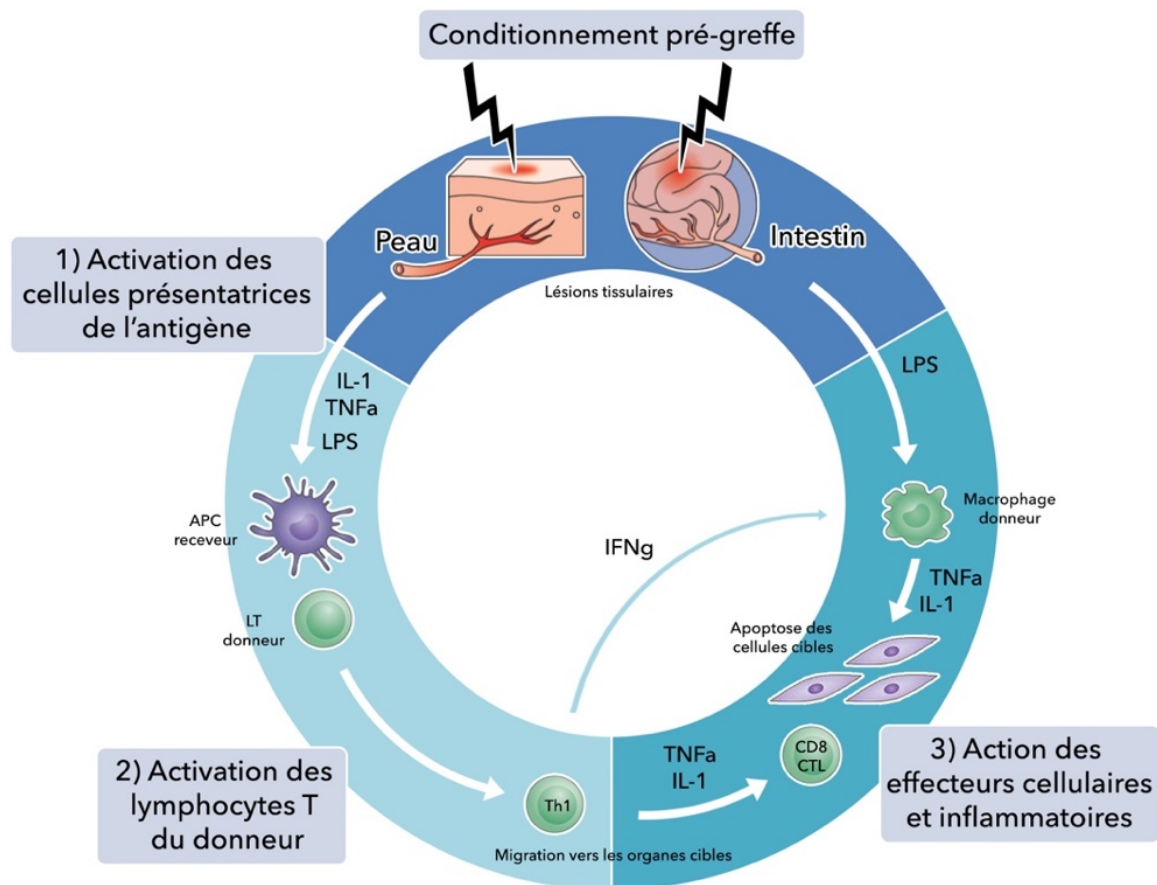
Les premiers essais d'alloCH chez l'homme sont rapportés dès le début des années 1960 et s'accompagnent des premiers cas de GVHa. Billingham en décrit les caractéristiques **(20)** et énonce notamment trois critères nécessaires au développement d'une réaction du greffon contre le receveur :

- Le greffon contient des cellules immunocompétentes.
- Le receveur exprime des antigènes majeurs ou mineurs absents chez le donneur.
- Le receveur est incapable de rejeter le greffon (insuffisance immunologique).

Il est désormais établi que les principales cellules immunocompétentes responsables de la GVHa sont les LT présents dans le greffon **(21,22)** car leur déplétion *ex vivo* diminue l'incidence de la GVHa mais altère également l'effet GVL **(23)**.

## b. Modèle physiopathologique de Ferrara

Les postulats de Billingham ont été étayés par les travaux de l'équipe de Ferrara qui ont permis de proposer un modèle de la physiopathologie de la GVHa à partir d'expérimentations réalisées chez la souris (24) (Figure D).



**Figure D – Physiopathologie de la GVHa aiguë d'après Ferrara et al.** Le conditionnement pré-greffe provoque des lésions tissulaires et le relargage de signaux de danger et de cytokines inflammatoires responsables de l'activation des CPA du receveur (1). Ces dernières peuvent alors activer les lymphocytes T allogéniques du greffon (2) et déclencher une cascade d'effecteurs cellulaires et inflammatoires menant à l'altération des tissus cibles (3). Adapté de : Ferrara et al., 2009 (15)

### i. Phase d'activation des CPA du receveur

La première phase, dite d'initiation, correspond au déclenchement de mécanismes inflammatoires classiques par les dommages tissulaires causés par le conditionnement pré-greffe, la pathologie primaire et/ou d'éventuelles infections. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) du receveur portent à leur surface les

antigènes responsables de l'alloréactivité : les molécules du CMH et les peptides qu'elles présentent (dans le cas des greffes avec disparité HLA) et/ou les antigènes mineurs d'histocompatibilité (dans le cas des greffes avec disparité HLA ou HLA appariées) **(25)**.

Les CPA sont activées au cours de l'initiation par trois types de molécules :

- les signaux de danger associés aux dommages (DAMP pour *damage-associated molecular pattern*) libérés au cours des lésions tissulaires, tels que l'adénosine triphosphate (ATP), l'héparane sulfate ou HMGB1 (*High-mobility group box 1*)
- les signaux de danger exogènes (PAMP pour *Pathogen-associated molecular-pattern*) libérés par des agents infectieux et/ou transférés à travers les épithéliums intestinaux et cutanés endommagés, tels que le lipopolysaccharide (LPS), la flagelline ou les motifs CpG non méthylés **(26)**
- les cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (*T helper type 1*), telles que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'interleukine-6 (IL-6) et le *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), sécrétées par les tissus lésés et les cellules immunitaires stimulées par les PAMP et DAMP

Les CPA détectent les signaux de danger par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, les PRR (*Pattern-recognition receptor*) comme les *Toll-like receptors* (TLR). L'activation s'accompagne de modifications phénotypiques qui aboutissent à l'expression membranaire des molécules de costimulation et des molécules du CMH, on parle de maturation des CPA.

## ii. Phase d'activation des LT du donneur

La deuxième phase correspond à l'activation des cellules immunocompétentes du donneur. Les LT naïfs sont polarisés et activés par les CPA au sein des organes lymphoïdes secondaires grâce à la présence de 3 signaux activateurs concomitants :

- Le premier signal est l'interaction des protéines du CMH et/ou des antigènes mineurs d'histocompatibilité présentés par les molécules du CMH (présentation directe) sur les CPA avec le récepteur T (TCR pour *T cell receptor*).



- Le deuxième signal est produit par la liaison des molécules de costimulation exprimées par les CPA activées (CD80/CD86, CD70, CD137L, OX40L, iCOS-L, CD40) avec leurs récepteurs spécifiques situés à la surface des LT allogéniques (respectivement CD28, CD27, CD137, OX40, iCOS, CD40L) **(27)**.
- Le troisième signal correspond aux cytokines nécessaires à la survie et à la prolifération des LT telles que l'interleukine-2 (IL-2), sécrétée de façon autocrine, ou l'interleukine-12 (IL-12), sécrétée de façon paracrine par les CPA activées.

Par ailleurs, les LT naïfs peuvent s'activer de la même façon dans les organes cibles de la GVHa, particulièrement au niveau du tractus digestif, au contact de CPA non hématopoïétiques (fibroblastes, cellules épithéliales) activées par le conditionnement **(28)**. Les CPA du donneur peuvent quant à elles apprêter et présenter des antigènes issus du receveur (présentation indirecte), bien que des travaux expérimentaux de Shlomchik aient montré que les CPA du receveur étaient nécessaires et suffisantes pour déclencher une GVHa induite par les LT CD8<sup>+</sup> **(29)**. L'activation des lymphocytes provoque le relargage de cytokines inflammatoires telles que l'IL-2, l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou le TNF- $\alpha$ . Les quantités sécrétées sont telles que l'on parle d'« orage cytokinique ».

### iii. Phase effectrice

La troisième phase correspond à la migration et à l'action des effecteurs cellulaires de la GVHa, guidés jusqu'aux organes cibles par des gradients de chimiokines. Notamment, le conditionnement pré-greffe induit la production de CCL3 et CCL4 par les cellules cutanées et hépatiques qui vont attirer les LT surexprimant le récepteur CCR5 lorsqu'ils sont activés **(30)**. Par ailleurs, l'IFN- $\gamma$  produit par les LT activés est distribué dans la circulation générale et induit l'expression de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 dans les organes cibles de la GVHa, permettant la migration des cellules effectrices exprimant le récepteur CXCR3 jusqu'à la peau, le tube digestif et le foie **(31)**. D'autres couples chimiokines/récepteurs peuvent être impliqués en fonction du contexte (notamment en fonction du type de conditionnement) et la complexité de ces interactions n'est encore que partiellement élucidée.

Les principaux effecteurs cellulaires recrutés sont les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8<sup>+</sup> et les cellules NK. Les voies effectrices prédominantes impliquent

l'interaction Fas/FasL, la production de perforine et de granzymes ainsi que la production de TNF- $\alpha$  (32,33). La voie cytotoxique Fas/FasL serait prédominante dans le foie tandis que le système perforine/granzymes serait mis en jeu dans les lésions de la peau et du tube digestif (34). L'action des LT et des NK est majorée par d'autres cellules infiltrant les tissus, par exemple, les polynucléaires neutrophiles (35) et les monocytes (36) qui créent un stress oxydatif en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Les lésions tissulaires entraînées par les réactions allogéniques fragilisent les barrières naturelles que sont les épithéliums cutané et digestif, favorisant le passage de composés inflammatoires (DAMP, PAMP, cytokines) et d'agents infectieux vers la circulation systémique. L'activation des cellules alloréactives est ainsi entretenue, on parle de « boucle inflammatoire ».

Il faut toutefois noter que, si le modèle physiopathologique de la GVHa est bien décrit et robuste chez la souris, de nombreux éléments doivent encore être validés chez l'homme.

### c. Quelques nouveaux concepts

De nombreuses recherches sont encore en cours pour préciser les mécanismes mis en jeu au cours de la GVHa et élargir les options thérapeutiques. Notamment, le rôle des différents effecteurs cellulaires s'est précisé et nuancé. Par exemple, si les LT participent à la mise en place de la GVHa, ce sont également eux qui soutiennent l'effet GVL. Par ailleurs, les LT régulateurs (LTregs) sont capables de diminuer la sévérité de la GVHa (37) et sont impliqués dans la mise en place de la tolérance à long terme après la greffe (38). De la même façon, les cellules NK participent aux dommages tissulaires en sécrétant du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$ , mais peuvent également participer à l'élimination des CPA du receveur et limiter la présentation des allo-antigènes (*via* les voies Fas/FasL et perforine-granzyme notamment) (39). D'autres cellules présentes dans le greffon hématopoïétique, comme les lymphocytes invariants NKT, participent également à la modulation de la GVHa en limitant la maturation des CPA et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les LT (40,41).

Il semble que l'activation des différentes cellules soit en grande partie influencée par le contexte général. Par exemple, le type de greffon choisi peut favoriser la présence

et l'action de certains types cellulaires. Des travaux ont notamment montré que la mobilisation de cellules souches périphériques par le G-CSF participe à l'émergence de cellules myéloïdes suppressives capables de limiter la réaction allogénique **(42)**. Le statut général est également influencé par la présence de signaux inflammatoires, dont un grand réservoir est représenté par les microbiotes, c'est-à-dire les microorganismes colonisant les épithéliums (gastro-intestinaux, cutanés, pulmonaires...).

### **i. Influence du microbiote**

Bien que le rôle des bactéries et de leurs composés dérivés (PAMP) soit étudié dans le contexte de la GVHa depuis les années 1970, le développement de nouvelles techniques a permis une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu. Le séquençage de l'ARN 16S bactérien a mis en évidence des modifications de composition et un effondrement de la diversité du microbiote au cours de la GVHa dans les modèles murins, mais aussi chez l'homme. Cette technologie permet de s'affranchir des étapes de culture et d'identification *in vitro* qui limitaient jusqu'alors l'étude du microbiote aux espèces cultivables et n'étaient pas représentatives de sa complexité. Ces aspects seront détaillés dans la partie III de ce travail. Toutefois, si l'importance du microbiote et de ses composés dérivés au cours de la GVHa est admise, les interactions entre les bactéries et leur hôte doivent être précisées.

Aussi, un niveau de régulation supplémentaire est amené par le virome intestinal, dont l'étude est encore naissante dans le contexte de la GVHa mais pourrait également ouvrir la voie à de nouvelles avancées thérapeutiques **(43)**.

### **ii. Biomarqueurs de GVHa**

Les modifications du microbiote pourraient également être analysées à des fins prédictives. De nombreuses études s'attachent en effet à mettre en évidence des biomarqueurs précoces de GVHa permettant de prédire sa sévérité, son caractère cortico-sensible ou le risque de mortalité non liée à la rechute. L'objectif de ces biomarqueurs est de guider les stratégies thérapeutiques. Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus sur les marqueurs qui peuvent être utilisés en clinique **(44)**. Toutefois, les dosages plasmatiques des protéines REG3a (*Regenerating islet-derived 3a*) et ST2 (*Suppression of tumorigenicity 2*) sont souvent cités car ils ont à la fois une valeur

diagnostique, pronostique et prédictive en permettant d'évaluer la réponse au traitement.

- REG3 $\alpha$  est un peptide antimicrobien (AMP) sécrété par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin grêle. Il a été montré que son taux plasmatique était trois fois plus élevé chez les patients au début du déclenchement d'une GVHa intestinale par rapport aux patients avec une forme cutanée isolée ou sans GVHa. Ce dosage précoce permet également de prédire la réponse au traitement et d'estimer la mortalité à un an **(45)**.
- ST2 est un membre de la famille des récepteurs à l'interleukine-1 dont le seul ligand connu est l'interleukine-33 (IL-33). La présence de sa forme soluble dans le plasma, au-dessus de valeurs seuils, est associée à une résistance aux corticostéroïdes et son évaluation dans le premier mois suivant la greffe permet d'apprécier le risque d'une GVHa réfractaire ainsi que la mortalité non liée à la rechute **(46)**.

L'utilisation de panels de plusieurs biomarqueurs combinés en algorithme semble en améliorer les propriétés prédictives **(47)**. REG3 $\alpha$  et ST2 peuvent y être associés à des paramètres définis au moment de la transplantation (e.g. ratio de LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> présents dans le greffon), des paramètres dynamiques (e.g. cytokines associées à la réponse T) ou des dosages de molécules libérées au cours des lésions tissulaires (e.g. élapine sécrétée par les kératinocytes lésés ou *Hepatocyte Growth Factor* [HGF] libéré lors de la réparation des lésions hépatiques). L'analyse de microARNs circulants, de vésicules extracellulaires ou du microbiote (séquençage de l'ARN 16S) sont également des paramètres en développement pour lesquels une harmonisation des techniques de quantification sera nécessaire avant la validation clinique **(44)**.

#### 4. Prophylaxie

La prise en charge courante de la GVHa chez les patients allogreffés est d'abord prophylactique et vise à atténuer la réponse allogénique par une immunosuppression systémique non spécifique. L'association d'inhibiteurs de calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) avec le méthotrexate reste le traitement de référence dans les greffes avec

conditionnement myéloablatif **(48)**. En Europe, le mycophénolate mofétil et les sérums anti-lymphocytaires sont largement utilisés en remplacement du méthotrexate. La stratégie préventive est adaptée selon le type de donneur et le type de conditionnement.

Les LT étant les principaux effecteurs de la GvH, des approches de déplétion (*ex vivo* ou *in vivo*) ont également été évaluées. Si la GVHa était moins sévère, l'incidence des retards de prise de greffe et des rechutes de la pathologie maligne était augmentée avec une susceptibilité accrue aux infections **(49)**.

Plus récemment, l'utilisation de fortes doses de cyclophosphamide après l'allogreffe a montré un effet protecteur contre la GVHa. Cet agent alkylant serait fortement cytotoxique pour les LT alloréactifs qui prolifèrent précocement après l'injection du greffon. Les LTregs présenteraient quant à eux des mécanismes de résistance leur permettant de persister chez le receveur **(50)**.

## **5. Traitement**

### **a. Première ligne : la corticothérapie**

Lorsque la GvH survient malgré la prophylaxie, le traitement standard des GVH aiguës est l'administration de corticostéroïdes, sous la forme de topiques locaux pour les formes cutanées restreintes ou par voie systémique pour les formes de plus haut grade. Environ 50% des malades répondent favorablement à la méthylprednisolone **(51,52)**. La prise en charge inclut par ailleurs le traitement des infections opportunistes et des symptômes du prurit, des douleurs abdominales, des troubles digestifs... Le recours à une nutrition adaptée (entérale ou parentérale) est fréquent en cas de GVH gastro-intestinale.

### **b. Seconde ligne : l'absence de consensus**

Une partie des patients reste réfractaire ou dépendante à la corticothérapie, nécessitant le recours à des protocoles de seconde ligne pour lesquels il n'existe pas de standard défini. La Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire indique qu'« il n'existe pas de consensus précis et de recommandations à donner en dehors de protocoles d'évaluation, compte tenu de l'absence de médicaments ayant une autorisation de mise sur le marché dans cette indication ».

Aux États-Unis, la seule molécule approuvée par la *Food and Drug Administration* pour le traitement des GVHa cortico-réfractaires est le ruxolitinib, un inhibiteur des Janus kinases 1 et 2 (53–55).

Les protocoles de thérapie de seconde ligne comprennent notamment les combinaisons d'immunosuppresseurs (sirolimus, méthotrexate, mycophénolate mofetil, tacrolimus), les sérums anti-lymphocytaires, la photophorèse extracorporelle (56), les anticorps monoclonaux (anti-CD25, -CD20, -CD52) ou les anti-TNF (57).

Le blocage des différents effecteurs cellulaires et moléculaires semble être une piste prometteuse, mais l'enjeu reste de diminuer la GVHa tout en préservant l'effet GVL, la prise de greffe et la mise en place d'une tolérance à long terme. Par exemple, la production d'IL-2 par les lymphocytes au cours de leur activation est une cible majeure de la prophylaxie et du traitement de la GVHa (cyclosporine, tacrolimus, anticorps anti-IL-2 ou anti-IL-2R). Toutefois, des études récentes ont montré que cette cytokine était également indispensable à la polarisation et au maintien des LTregs. Ce type de traitement peut alors interférer avec la mise en place d'une tolérance à long terme (58). De la même façon, le blocage du récepteur aux chimiokines CCR5 limite la migration dans les organes cibles des LT activés cytotoxiques mais aussi celle des LTregs (59).

L'avancée des connaissances sur le microbiote intestinal a mené les cliniciens à une approche prophylactique et thérapeutique innovante : la transplantation de microbiote fécal (FMT) qui vise à restaurer la diversité du microbiote des patients allogreffés à partir du microbiote sain d'un donneur différent du donneur de cellules hématopoïétiques (60). Ce type de protocole a montré des résultats prometteurs dans les GVHa intestinales cortico-réfractaires (61) et doit être confirmé par de plus larges études prospectives.

Toutefois, les thérapies de seconde ligne ont une efficacité modérée et la GVHa cortico-réfractaire reste associée à une morbidité importante, principalement à cause des complications infectieuses. Des études cliniques prospectives randomisées multicentriques et le développement de nouvelles approches apparaissent nécessaires pour le traitement des GVHa réfractaires.

## 6. Modèles expérimentaux de GVH aigüe

### a. Principaux modèles murins de GVHa

L'utilisation de modèles expérimentaux, principalement chez la souris, a permis d'appréhender les mécanismes biologiques de la GVHa. Ces modèles sont encore utilisés aujourd'hui pour affiner la connaissance des mécanismes impliqués et tester de nouvelles approches thérapeutiques. Ils reposent généralement sur le conditionnement des souris receveuses par ICT à dose létale ou sub-létale, éventuellement fractionnée en plusieurs séances, suivi par l'administration d'une suspension de CSH (souvent issues de la moelle osseuse) additionnées de cellules immunocompétentes (splénocytes ou LT triés). Le degré d'histocompatibilité entre les donneuses et receveuses varie selon l'haplotype H-2 (système CMH murin) des souches considérées. Par exemple, il existe une disparité majeure entre une souris donneuse C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) et une souris receveuse BALB/c (H-2<sup>d</sup>). D'autres types de greffes expérimentales permettent de mimer la situation clinique comme la greffe haplo-identique dite « parent-enfant » (par exemple : C57Bl/6 → B6D2F1) ou la greffe H-2 identique avec disparité d'antigènes mineurs d'histocompatibilité (par exemple : C57Bl/6 → BALB/b).

Les résultats du groupe « allogénique/*mismatch* » sont généralement comparés à un groupe « syngénique » où les souris reçoivent des cellules provenant de donneuses de la même souche. La validité de chaque expérience est contrôlée à l'aide d'un groupe « conditionnement seul » (100% de mortalité attendue dans le cas des conditionnements myéloablatifs) et d'un groupe « moelle osseuse seule » (permettant de vérifier la qualité du greffon et l'absence de mortalité liée à une infection).

L'injection des cellules immunocompétentes aboutit plus ou moins rapidement au développement d'une GVHa dont l'intensité varie en fonction des paramètres précédemment cités. L'apparition et l'évolution de la maladie sont appréciées en fonction de la survie, du score clinique et des atteintes histologiques principalement. Le score clinique de référence a été décrit par Ferrara et prend en compte 5 critères (décrits dans la **Table C**) (**62**). La sévérité de la GVHa peut également être appréciée à l'aide des biomarqueurs plasmatiques REG3 $\gamma$  (équivalent murin de REG3 $\alpha$ ) (**63**) ou ST2 soluble (**64**).

Critère	Grade 0	Grade 1	Grade 2
Perte de poids	< 10%	comprise entre 10 et 25%	> 25%
Posture	normale	courbure au repos	courbure sévère perturbant les mouvements
Activité	normale	diminution légère à modérée	immobile en absence de stimulation
Aspect de la fourrure	normal	poils légèrement à modérément ébouriffés	poils sévèrement ébouriffés / toilette négligée
Intégrité de la peau	normale	desquamation de la queue / des pattes	zones évidentes de peau dénudée

**Table C – La sévérité de la GVHa chez la souris est généralement appréciée à l'aide d'un score clinique comprenant 5 critères évalués de 0 à 2.** Les critères recouvrent la perte de poids et l'aspect général de l'animal. Adapté de : Cooke et *al.*, 1996 (62).

### b. Apports et limites des modèles expérimentaux

Les rongeurs représentent un bon modèle pour l'étude de la GVHa car ils possèdent un système immunitaire proche de celui de l'homme, avec des populations cellulaires et des effecteurs moléculaires conservés entre les espèces. Par ailleurs, de nombreux outils permettant d'apprécier la fonction du système immunitaire (tels que les anticorps monoclonaux) sont disponibles pour ces espèces. Toutefois, plusieurs différences ont déjà été mises en évidence (65), par exemple :

- L'hématopoïèse splénique persiste à l'âge adulte chez la souris.
- Les polynucléaires neutrophiles sont les principaux leucocytes circulants chez l'homme, alors qu'il s'agit des lymphocytes chez la souris.
- Les TLR ne sont pas exprimés par les mêmes cellules et présentent des sensibilités différentes vis-à-vis de leurs ligands (PAMP ou DAMP).

Le contexte est également un important facteur de variation car les animaux utilisés dans les études précliniques sont élevés dans des conditions protégées afin de limiter les biais expérimentaux tandis que la situation des patients est beaucoup plus complexe (antécédents médicaux, maladie primaire, variabilité génétique...).

Socié et Blazar ont identifié cinq limites majeures des modèles expérimentaux de GVHa (66) détaillées dans la **Table D**. Par ailleurs, il est admis que les associations de souches donneuse → receveuse aboutissent à des réponses cellulaires différentes (prédominance des LT CD4<sup>+</sup> ou des LT CD8<sup>+</sup>) (67).



Limite	Modèles précliniques	Situation clinique usuelle
Conditionnement	Souvent ICT seule	Chimiothérapie ± ICT
Compatibilité donneur-receveur	Disparités majeures et/ou mineures	Identité HLA + disparités mineures
Source du greffon	Moelle osseuse (peu de LT) et splénocytes	Moelle osseuse (+ jusqu'à 10% de LT circulants) ou sang périphérique
Microbiote	Souris élevées en absence d'agents pathogènes spécifiques	Historique pouvant influencer le microenvironnement
Âge du receveur	Souris jeunes adultes	Patients âgés de 50 ans et plus

**Table D – Plusieurs différences entre les modèles établis au laboratoire et les situations cliniques peuvent limiter la reproductibilité des études et leur application chez l'homme.** Ces divergences concernent principalement le protocole de greffe et les caractéristiques du receveur. Adapté de : Socié et Blazar, 2009 (66).

Les modèles expérimentaux ne seront jamais des représentations parfaites de la situation clinique. Toutefois, la description de ces modèles et la connaissance de leurs limites respectives permettent de continuer à décrire les mécanismes physiopathologiques et à évaluer des pistes pour la prophylaxie et le traitement de la GVHa. Plusieurs modèles se rapprochant de la situation clinique ont été décrits (conditionnement par chimiothérapie, disparités mineures, greffons de cellules périphériques mobilisées, xéno greffe) (68) et combiner plusieurs modèles complémentaires permet certainement d'avoir la vision la plus précise possible de la maladie chez l'homme.

### III. Microbiote et perméabilité intestinale au cours de la GVH aigüe

#### 1. La barrière intestinale : organisation et immunité

La paroi intestinale est constituée d'un épithélium prismatique unistratifié qui assure un rôle de barrière sélective entre le contenu de la lumière du tube digestif et le reste de l'organisme. Elle assure, entre autres, l'absorption de l'eau, des nutriments et limite la pénétration des microorganismes colonisant le tube digestif et de leurs métabolites. Ce rôle de barrière sélective est assuré par les cellules, les jonctions intercellulaires, le mucus et les cellules immunitaires associées à la muqueuse.

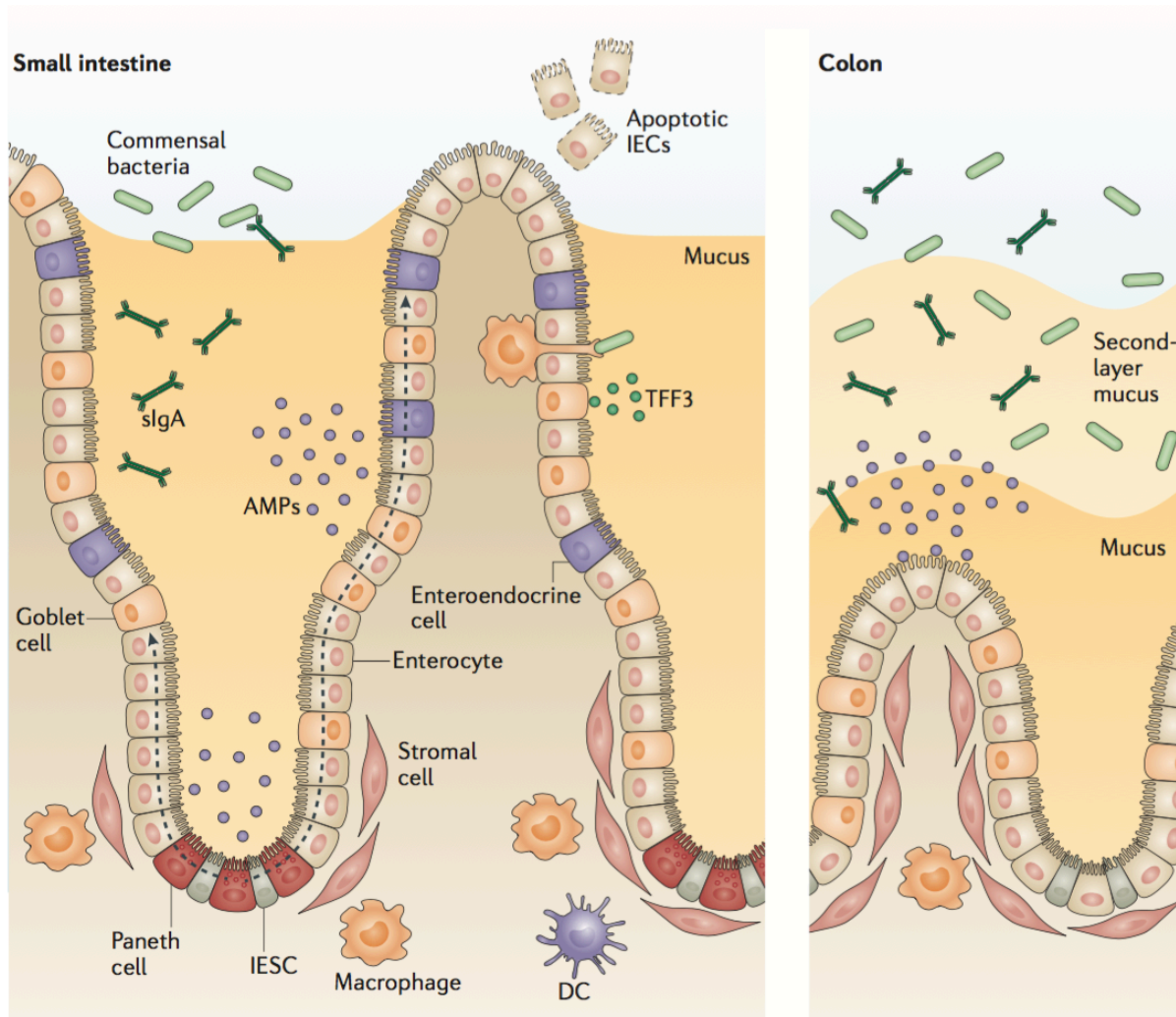
##### a. Barrière cellulaire : caractéristiques et fonctions des différentes cellules intestinales

L'épithélium de l'intestin grêle présente des villosités et des invaginations appelées cryptes intestinales. Le fond des cryptes est constitué par des cellules souches intestinales qui vont progressivement remonter jusqu'au sommet des villosités au cours de leur différenciation en cellules épithéliales ou sécrétrices. Ce mécanisme assure le renouvellement complet de l'épithélium en 4 à 5 jours.

On distingue plusieurs types de cellules différenciées (**Figure E, gauche**) :

- Les entérocytes sont les principales cellules de structure et assurent l'absorption des nutriments *via* leur bordure en brosse apicale.
- Les cellules de Paneth, situées au fond des cryptes, sécrètent des AMP régulant la composition du microbiote.
- Les cellules caliciformes sécrètent le mucus qui tapisse l'épithélium.
- Les cellules entéro-endocrines régulent les fonctions digestives par la production d'hormones.
- Les cellules M (pour *microfold*) sont des cellules épithéliales spécialisées dans la capture et le transport des antigènes luminaux vers les cellules immunitaires.

Au niveau du colon, l'épithélium intestinal est dépourvu de villosités, de cellules entéro-endocrines et de cellules de Paneth (**Figure E, droite**) (69).



**Figure E – L'épithélium intestinal possède une structure en cryptes/villosités.** Le fond des cryptes de l'intestin grêle contient une niche de cellules souches (IESC pour *intestinal epithelial stem cells*) assurant le renouvellement de l'épithélium constitué d'entérocytes, de cellules de Paneth, de cellules caliciformes (*goblet cells*) et de cellules entéro-endocrines. L'épithélium du colon est dépourvu de villosités et de cellules de Paneth. Source : Peterson et Artis, 2014 (69)

### b. Barrière physique : les jonctions intercellulaires

Les cellules épithéliales intestinales (IEC) sont étroitement liées par des jonctions intercellulaires sur leurs faces latérales : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. L'épithélium forme ainsi une barrière semi-perméable sélective vis-à-vis de la lumière intestinale. Les deux modalités de passage trans-épithélial sont la voie intracellulaire qui met en jeu un transport actif *via* des transporteurs spécifiques et la voie paracellulaire régulée principalement par les jonctions serrées sensibles aux cytokines pro-inflammatoires, aux facteurs de croissance, à certains pathogènes et à des éléments dérivés de l'alimentation (70).

### **c. Barrière chimique : le mucus**

Le mucus est un gel visqueux recouvrant la surface des IEC formé par l'assemblage de longues glycoprotéines, telles que la mucine-2 sécrétée par les cellules caliciformes. Il participe à la compartimentation entre le contenu du tube digestif et l'organisme. Le mucus assure une fonction de barrière physique car sa composition le rend plus ou moins pénétrable, mais aussi de barrière chimique car il contient les molécules antimicrobiennes sécrétées par les IECS.

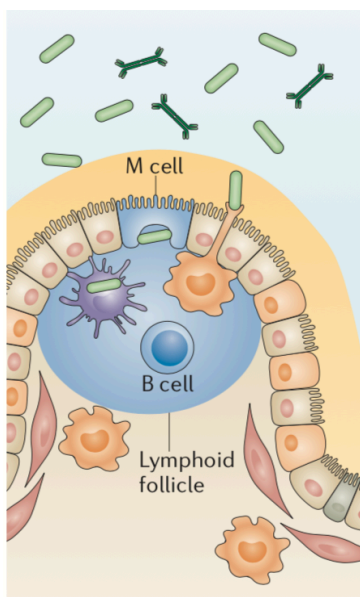
L'intestin grêle est tapissé d'une fine monocouche de mucus, dont les microorganismes sont exclus par des AMP produites par les cellules de Paneth principalement. Les défensines (comme REG3 $\alpha$ ), les cathelicidines et les lysozymes possèdent des activités bactéricides, virucides et fongicides directes. Les AMP induisent notamment la formation de pores dans la membrane des bactéries (71). Les AMP contenus dans la couche de mucus limitent ainsi la colonisation bactérienne, régulent la composition du microbiote intestinal en faveur des espèces commensales et symbiotiques et limitent le passage des microorganismes vers les tissus de l'hôte. Au niveau du colon, l'absence de cellules de Paneth dans les cryptes limite la sécrétion d'AMP. L'épithélium y est recouvert par deux couches distinctes de mucus. La couche interne est ancrée aux cellules, elle est très dense et peu perméable tandis que la couche externe est plus lâche. Cette seconde couche offre un substrat d'attache et de nutrition pour les bactéries commensales (72).

### **d. Immunité associée à la muqueuse intestinale**

L'épithélium intestinal participe à l'intégration des signaux du microenvironnement pour assurer la régulation de la colonisation par les microorganismes, la fonction de barrière et les réponses immunitaires muqueuses. Les cellules immunitaires résidentes et circulantes assurent la détection et l'élimination des microorganismes pathogènes qui auraient traversé la barrière intestinale. Elles participent également au maintien de la tolérance vis-à-vis des bactéries commensales. Exposées en permanence à des antigènes et des métabolites provenant du microbiote, de l'alimentation et du métabolisme, les cellules immunitaires doivent maintenir un équilibre fragile (69). Cette balance immunitaire est complexe, dynamique et finement régulée pour éliminer les agents infectieux tout en limitant l'inflammation.

Des cellules de l'immunité innée (cellules épithéliales et CPA) et de l'immunité adaptative (lymphocytes) sont associées à la muqueuse et distribuées tout au long de l'intestin. Les cellules immunitaires coexistent sous deux formes : dispersées dans la *lamina propria* (le tissu conjonctif qui soutient l'épithélium intestinal) ou organisées en structures pluricellulaires. On distingue les structures macroscopiques, les plaques de Peyer (PP), des structures microscopiques, les follicules lymphoïdes isolés (ILF) qui comprennent notamment les cellules M (**Figure F**).

Par ailleurs, le tube digestif est amplement drainé par le système lymphatique, notamment au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques (MLN pour *mesenteric lymph nodes*). Des travaux récents montrent que chaque région de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon et colon) dispose d'un drainage ganglionnaire particulier qui entraîne des réponses immunitaires spécifiques. Par exemple, les MLN irriguant le duodénum favoriseraient l'induction de LTregs spécifiques des antigènes alimentaires. Cette réponse serait régulée par le microbiote et les nombreuses cellules dendritiques (DC) CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> présentes dans ces ganglions. A l'inverse, les MLN irriguant le colon favoriseraient les réponses pro-inflammatoires Th17 *via* les DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> (73).








**Figure F – Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés sont organisés autour des cellules M.** Ces cellules épithéliales sont spécialisées dans la capture et le transport des antigènes luminaux vers les cellules immunitaires sous-jacentes. Les APC ont aussi un rôle de capture (*via* des prolongements transépithéliaux) et de présentation des antigènes. Source : Peterson et Artis, 2014 (69)

### i. Présentation des antigènes

La capture des antigènes de la lumière intestinale peut impliquer (i) les cellules M des PP et des ILF, (ii) les CPA émettant des prolongements dans la lumière intestinale, ou (iii) directement les cellules épithéliales. Les principales CPA impliquées sont les DC CD103<sup>+</sup>, qui migrent ensuite vers les MLN pour relayer l'antigène et le contexte inflammatoire aux cellules effectrices, et les macrophages résidents CX3CR1<sup>high</sup> qui assurent la phagocytose des microorganismes et des IECs apoptotiques (74,75). Les antigènes sont ensuite présentés sur place ou dans les MLN aux LT et aux lymphocytes B (LB).

### ii. Lymphocytes T

L'expression de l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  et du récepteur aux chimiokines CCR9 permet la domiciliation des LT dans le tube digestif en interagissant respectivement avec la molécule d'adhérence MadCAM-1 et avec CCL25, toutes deux produites par les cellules endothéliales intestinales. Les LT sont activés et polarisés en fonction du contexte inflammatoire vers un phénotype pro-inflammatoire (effecteur) ou anti-inflammatoire (régulateur) tels que décrits dans la **Table E**.

	Phénotypes effecteurs			Phénotypes régulateurs	
					
<b>Cytokines polarisantes</b>	IL-12 IFN- $\gamma$	IL-4	IL-6 IL-23 TGF- $\beta$	TGF- $\beta$ absence d'IL-6	IL-10 IL-27
<b>Facteurs de transcription</b>	Stat1 Stat4 Tbet	Stat6 Gata3	Stat3 ROR- $\gamma$ t	FoxP3	c-Maf Blimp-1
<b>Cytokines synthétisées</b>	IL-2 IFN- $\gamma$	IL-4 IL-5 IL-13	IL-17 IL-6	TGF- $\beta$	IL-10 IL-21

**Table E – Les principaux types de LT activés dans la muqueuse intestinale sont effecteurs ou régulateurs.** Leur polarisation est dépendante de la présence de cytokines qui induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Chaque type sécrète préférentiellement certaines cytokines qui participent à leur action et amplifient la réponse immunitaire. TGF- $\beta$  : *Transforming growth factor- $\beta$* . D'après : Shale et al., 2013 (76) et Luu et al., 2017 (77)

Ainsi, le phénotype Th1 participe à la réponse aux infections bactériennes intracellulaires, le phénotype Th2 aux infections parasitaires et le phénotype Th17 aux infections bactériennes extracellulaires et fongiques (76). Les LTregs retrouvés dans la muqueuse intestinale sont principalement des LTregs induits (iTregs) parmi lesquels on distingue les LTregs FoxP3<sup>+</sup> (*Forkhead box P3*) et les LTregs de type 1 (Tr1) FoxP3<sup>-</sup>. Ces cellules participent au maintien de l'homéostasie tissulaire en limitant les réactions inflammatoires et en favorisant la résolution de l'inflammation (77).

### iii. Lymphocytes B

Les LB naïfs des centres germinatifs des PP et ILF peuvent se différencier en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines A (IgA) par l'action : des CPA, de la molécule de costimulation CD40L présente à la surface des LT activés (78) et/ou des cytokines APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) et BAFF (*B-cell activating factor*) (79,80) sécrétées par les CPA et par les IEC. Les IgA dimériques transitent ensuite à travers les IEC et sont retenues dans la couche muqueuse où elles peuvent capter les antigènes et les toxines et empêcher leur pénétration dans le tissu sous-jacent par encombrement stérique.

### iv. Innate lymphoid cells (ILC)

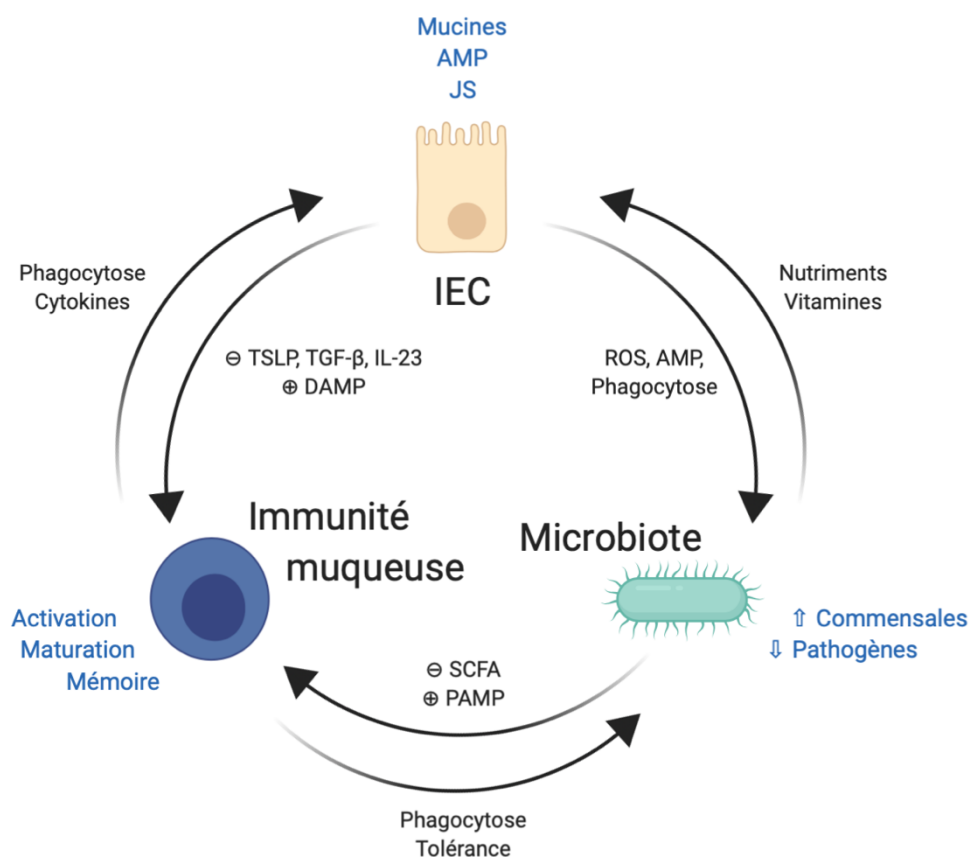
Les *innate lymphoid cells* (ILC) sont des cellules lymphoïdes dépourvues de récepteur spécifique à l'antigène décrites dans les années 2010 (81). Elles résident dans les muqueuses telles que l'épithélium intestinal et sécrètent rapidement des cytokines pour lutter contre les infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires. Elles participent aussi à la régulation du microbiote et de la réparation tissulaire. Trois groupes d'ILC sont décrits (82) :

- les ILC1 produisent des cytokines Th1 (et comprennent également les cellules NK)
- les ILC2 produisent des cytokines Th2
- les ILC3 produisent des cytokines Th17/22

Les ILC3 ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie car, lors de la détection de certains pathogènes, elles produisent de l'IL-22 qui stimule la sécrétion d'AMP par les cellules de Paneth (83).

### v. Régulation de l'immunité muqueuse

Les réponses immunitaires au niveau de l'épithélium intestinal doivent être finement régulées afin de garantir une réponse efficace contre les pathogènes provenant du microbiote sans toutefois que la réaction inflammatoire soit disproportionnée ou soutenue dans le temps. Pour atteindre cet équilibre dynamique, les IEC, les cellules immunitaires et le microbiote communiquent continuellement pour établir une régulation réciproque. Quelques exemples de ces interconnexions sont présentés dans la **Figure G** et comprennent la régulation par les métabolites bactériens de la production de mucus des cellules caliciformes (84) et de la production d'AMP des cellules de Paneth (85).



**Figure G** – L'homéostasie intestinale est maintenue grâce à une communication fine et dynamique entre les IEC, l'immunité muqueuse et le microbiote. Chaque type de cellules ou de microorganismes envoie des signaux dans l'environnement qui permettent de maintenir une harmonie entre réponse immunitaire contre les pathogènes et tolérance envers les antigènes commensaux. Les fonctions régulées sont indiquées en bleu et les signaux impliqués sont mentionnés au-dessus des flèches. JS : Jonctions serrées, TSLP : *thymic stromal lymphopoietin*, SCFA : *short chain fatty acid*. D'après : Peterson et Artis, 2014 (69)



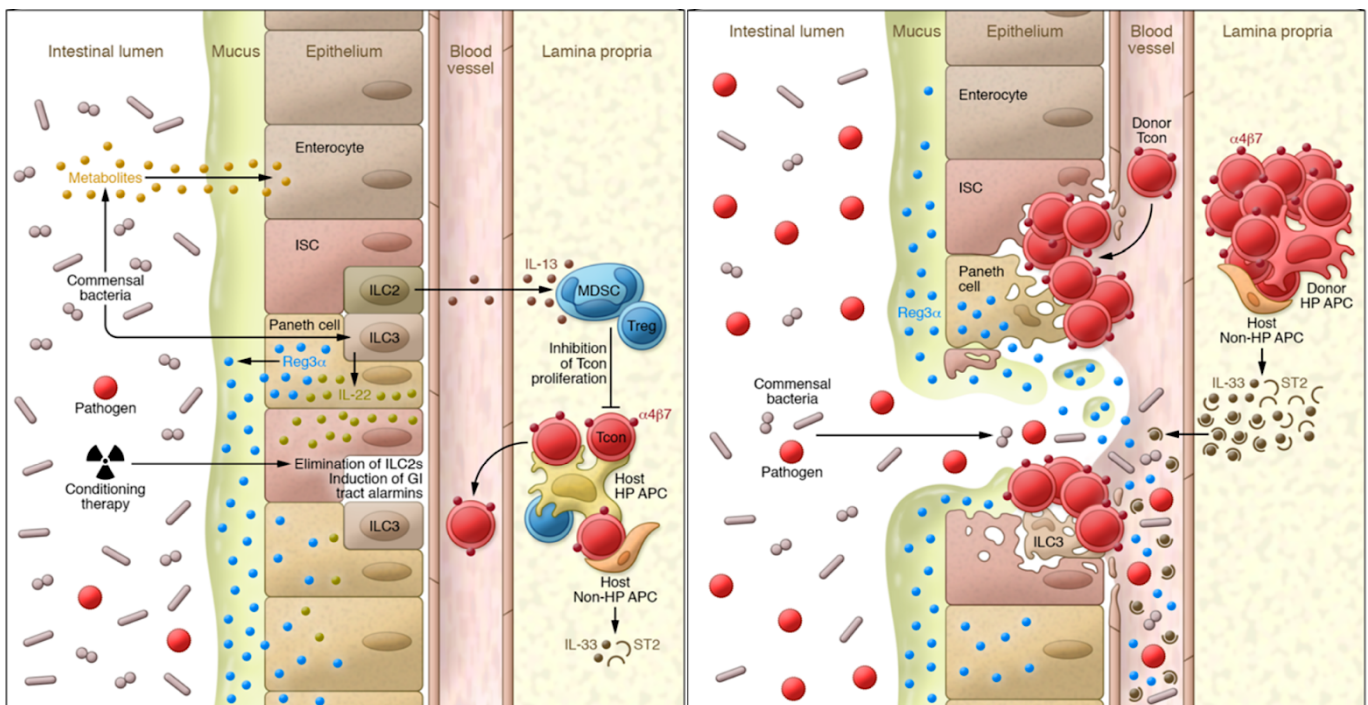
## 2. Composition et diversité du microbiote chez le sujet sain

Le microbiote intestinal est l'ensemble des microorganismes colonisant la partie distale du tube digestif. Il représente les bactéries, virus, champignons et parasites non pathogènes, dits « commensaux », qui évoluent dans la lumière intestinale ou dans la couche de mucus qui tapisse l'épithélium. Les microorganismes commensaux entretiennent une relation symbiotique en soutenant les fonctions digestives (fermentation et assimilation des nutriments, hydrolyse des polysaccharides, synthèse des vitamines K, B12 et B8, métabolisation des acides biliaires...). De plus, ils luttent contre la colonisation de l'intestin par des espèces pathogènes (compétition et production de lantibiotiques et bactériocines bactéricides) **(86)**. Par ailleurs, les bactéries intestinales produisent des métabolites tels que les acides gras à courte chaîne (SCFA pour *short chain fatty acid*) issus du catabolisme des polysaccharides alimentaires. Les principaux SCFA sont l'acétate (2 carbones), le propionate (3 carbones) et le butyrate (4 carbones). En constituant des substrats énergétiques pour les IEC, ils participent à l'homéostasie de la barrière intestinale.

Le microbiote intestinal sain d'un individu adulte est caractérisé par sa grande diversité et serait composé de plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes. Sa composition est propre à chaque individu et dépend de l'âge, de facteurs génétiques, alimentaires et environnementaux (hygiène, traitements médicaux...). Les projets de séquençage du génome bactérien *MetaHIT* et *Human Microbiome project* ont mis en évidence plus de 2000 espèces bactériennes pouvant entrer dans la composition du microbiote d'un individu. Elles sont principalement réparties dans les phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* **(87,88)**. La diversité du microbiote peut être quantifiée à l'aide des index de Shannon ou de Simpson. Ils mesurent le nombre d'espèces différentes (richesse) mais également leur représentation (abondance relative) pour établir un tableau complet de la communauté bactérienne.

### 3. Perturbations de l'homéostasie intestinale au cours de la GVHa

La perte d'intégrité de la barrière intestinale, la diminution de la diversité bactérienne ainsi que le phénomène de translocation sont au cœur des mécanismes physiopathologiques de la GVHa résumés dans la **Figure H**.



**Figure H – Des évènements précoces (gauche) et tardifs (droite) au sein du tube digestif participent à la physiopathologie de la GVHa.** Le conditionnement et les premières réactions allogéniques de la GVHa détruisent les ILC2 de l'épithélium intestinal provoquant *i)* le relargage de DAMP et *ii)* l'inhibition des mécanismes de tolérance impliquant les MDSC (*Myeloid derived suppressor cells*) et les Tregs. Les LT alloréactifs ne sont plus réprimés, rejoignent le tissu épithélial et provoquent les lésions plus tardives. Ils éliminent d'autres cellules cruciales pour l'homéostasie intestinale : les cellules de Paneth, les ILC3 et les cellules souches intestinales. L'épithélium se retrouve perméabilisé et ne peut plus assurer sa fonction de barrière. Dans le même temps, les bactéries commensales ne sont plus prédominantes, ce qui favorise l'émergence de pathogènes pouvant pénétrer jusqu'à la circulation sanguine. Les évènements tardifs de la physiopathologie de la GVHa intestinale provoquent la libération de DAMP et de PAMP qui participent à l'entretien de la réaction inflammatoire. Source : Ferrara et al., 2017 (89)

#### a. Perte d'intégrité épithéliale

L'homéostasie et l'intégrité de la barrière intestinale sont compromises par le développement de la GVHa. Dès le début des années 1990, des observations cliniques ont montré que l'augmentation des doses d'ICT était associée à une hausse de l'incidence de la GVHa et de la mortalité (90). La confirmation de ces données dans

un modèle murin a mis en évidence que l'ICT et les réactions allogéniques précoces de la GVHa ont un effet synergique sur les lésions de l'épithélium intestinal (apoptose des IEC, présence d'un infiltrat inflammatoire et désorganisation de la structure cryptes/villosités de l'épithélium). Précocement, les ILC2 sont altérées et la tolérance médiée par les MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) et les Tregs **(91)** est rompue. Les LT alloréactifs peuvent alors rejoindre le tissu épithélial et léser d'autres cellules importantes pour l'homéostasie intestinale : les cellules de Paneth, les ILC3 et les cellules souches intestinales. L'épithélium se retrouve perméabilisé et ne peut plus assurer sa fonction de barrière. Par ailleurs, les macrophages activés par le conditionnement sécrètent davantage de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  qui ont des effets toxiques directs et participent à l'entretien de la réponse inflammatoire **(92)**. L'IL-22 pourrait également jouer un rôle majeur dans la rupture d'équilibre, car les effets de cette cytokine sont pléiotropiques. L'IL-22 sécrétée par les ILC3 dans des conditions physiologiques participe au renouvellement des cellules souches intestinales. A l'inverse, dans un contexte de GVHa intestinale, la majeure partie de l'IL-22 est produite par les LT allogéniques et participe, en association avec les interférons de classe I, au maintien de l'inflammation locale **(93)**.

Les dommages tissulaires causés par le conditionnement et les réponses allogéniques provoquent le relargage de signaux de danger par les IEC. Les DAMP sont des éléments (molécules ou organites) intracellulaires qui deviennent pro-inflammatoires en étant libérés dans le milieu extracellulaire à cause d'un dommage infligé à une cellule. Par exemple, l'ATP, l'acide urique, HMGB1, les mitochondries ou les histones sont reconnus par des PRR spécifiques, tels que les TLR, à la surface des cellules immunitaires. Cette liaison active les inflammasomes NLRP (*NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing*) -2, -3 et -6 et provoque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 qui participent à l'entretien de l'orage cytokinique **(89)**. Les CPA peuvent aussi être activées par des molécules de la matrice extracellulaire qui s'accumulent dans le plasma à la suite des dommages épithéliaux. Par exemple, les taux d'héparane sulfate plasmatiques sont augmentés au cours de la GVHa et ce DAMP peut être reconnu par le TLR4 des cellules dendritiques **(94)**.

Les lésions macroscopiques, telles que les patches de cellules apoptotiques et la perturbation de la structure épithéliale, favorisent la perméabilité de l'intestin (on parle

de « *leaky barrier* »). Une étude clinique pilote (95) a récemment suggéré que la perméabilité paracellulaire était également amplifiée à cause d'une désorganisation des jonctions serrées, confirmant des données expérimentales (96). Il est aussi connu que l'IFN- $\gamma$ , sécrété en grande quantité au cours de l'initiation de la GVHa, peut augmenter la perméabilité intercellulaire en induisant l'internalisation des jonctions serrées (97) et que la GVHa induit la réorganisation des chaînes de myosine impliquées dans ces jonctions (98). La perméabilité transcellulaire aux macromolécules semble également augmentée de façon très précoce. L'ensemble de ces résultats convergent vers l'altération de l'épithélium intestinal et de sa fonction de barrière au cours de la GVHa.

### b. Dysbiose

Le rôle joué par le microbiote intestinal dans les complications de l'alloCH n'est pas un concept nouveau. La décontamination partielle ou totale du tube digestif à l'aide d'antibiotiques a longtemps été une approche prophylactique de la GVHa et des infections (99). Toutefois, cette pratique montre des résultats mitigés entre les différents centres de greffe et selon les antibiotiques utilisés. De plus, ces études du microbiote dépendaient des techniques de culture *in vitro* et le plus vaste tableau offert par le séquençage du génome bactérien incite plutôt à préserver la diversité en limitant l'utilisation d'antibiotiques à large spectre.

Il a été montré que la perte de diversité, ou dysbiose, était statistiquement associée à une plus forte mortalité et que l'estimation de l'index de Simpson à la prise de greffe constituait un facteur indépendant et prédictif de la mortalité liée à la greffe. Les auteurs ont mis en évidence la prépondérance des entérocoques, des streptocoques, des entérobactéries (*Escherichia* et *Kluyvera*) et des lactobacilles chez les patients atteints de GVHa et présentant une faible diversité (100).

Les travaux de l'équipe de Teshima sur des modèles expérimentaux (101,102) ont montré que les réactions allogéniques, majorées par les effets du conditionnement, détruisaient les cellules de Paneth. Ces cellules des cryptes intestinales sécrètent des AMP ( $\alpha$ -défensines) et régulent ainsi la composition du microbiote intestinal. Leur disparition au cours de la GVHa entraîne une dysbiose avec une prédominance de bactéries à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli*. En revanche, la persistance de

certaines souches bactériennes, telles que *Blautia luti* (phylum *Firmicutes*, classe *Clostridia*) est associée à une réduction du risque de mortalité liée à la GVHa **(103)**.

Les métabolites produits par le microbiote semblent également avoir un impact notable sur la sévérité de la maladie. Dans des modèles expérimentaux, il a été montré que la GVHa est associée à la diminution du butyrate (SCFA produit exclusivement par les bactéries intestinales du genre *Clostridium*) dans les IEC. L'administration d'un cocktail bactérien permettant de rétablir la concentration de butyrate diminue la sévérité de la GVHa **(104)**. D'autre part, les indoles issus de la métabolisation bactérienne du tryptophane permettraient de contrôler la sévérité de la GVHa en protégeant les IEC et en réduisant l'inflammation intestinale **(105)**.

La dysbiose participe ainsi à l'entretien de la réponse inflammatoire intestinale mais il reste à déterminer si elle est une cause ou une conséquence de la GVHa. Plusieurs études cliniques suggèrent de préserver la diversité microbienne en limitant la nutrition parentérale **(106,103)** voire de corriger la dysbiose grâce à une FMT **(60,107)**.

### **c. Translocation de bactéries et de composés bactériens**

Le défaut de fonction de la barrière intestinale associé à la modification de la composition du microbiote intestinal comptent ainsi parmi les principaux facteurs qui déclenchent et entretiennent l'orage cytokinique et la réaction inflammatoire au cours de la GVHa. La combinaison de ces deux événements augmente le passage de bactéries et de composés bactériens à travers l'épithélium intestinal vers les ganglions mésentériques, puis les organes distants *via* la circulation sanguine et lymphatique. Ce phénomène, appelé translocation bactérienne digestive, a été décrit par Berg et Garlington en 1979 **(108)**.

La plupart des bactéries sont capables de traverser la barrière intestinale lorsqu'elle est lésée. Toutefois, les bactéries à Gram négatif aérobies ou anaérobies facultatives semblent plus enclines à rejoindre la circulation générale **(109)**. La lyse et la multiplication des bactéries provoquent le relargage de composés membranaires qui s'ajoutent à ceux directement transloqués à travers l'épithélium. Ces molécules peuvent être toxiques pour le fonctionnement cellulaire de l'hôte (on parle d'endotoxines) et sont plus ou moins immunogènes. En effet, elles font partie des

PAMP reconnus par le système immunitaire. Leur accumulation peut provoquer un syndrome inflammatoire systémique, appelé sepsis, pouvant entraîner des complications potentiellement létales (choc septique et défaillances d'organes). Par exemple, les LPS s'accumulent progressivement dans le foie, la rate puis la circulation générale de souris atteintes de GVHa **(110)** et participent à l'activation des macrophages **(111)** ainsi qu'au recrutement des polynucléaires neutrophiles **(35)**.

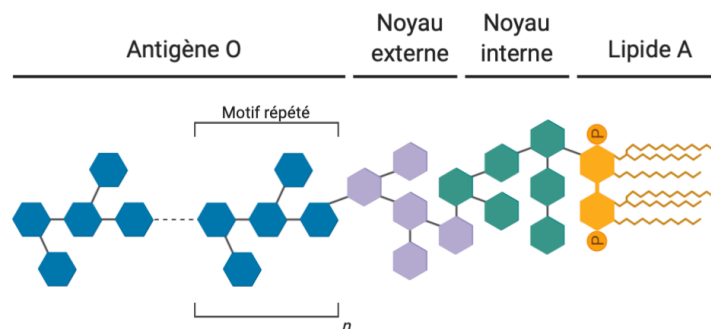
## IV. Les lipopolysaccharides (LPS), signaux initiateurs de la GVH aiguë

### 1. Structure et propriétés des LPS

#### a. Définition et structure générale

Le terme « endotoxines » a été introduit par Richard Pfeiffer à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle à propos de substances produites par *Vibrio cholerae* conservant leurs propriétés toxiques et pyrogènes même après la destruction thermique de la bactérie. Il oppose ces composés intrinsèques aux exotoxines qui sont activement excrétées par les bactéries vivantes. Il faut attendre les années 1930-1950 pour que ces molécules soient purifiées et prennent le nom de lipopolysaccharides **(112)**.

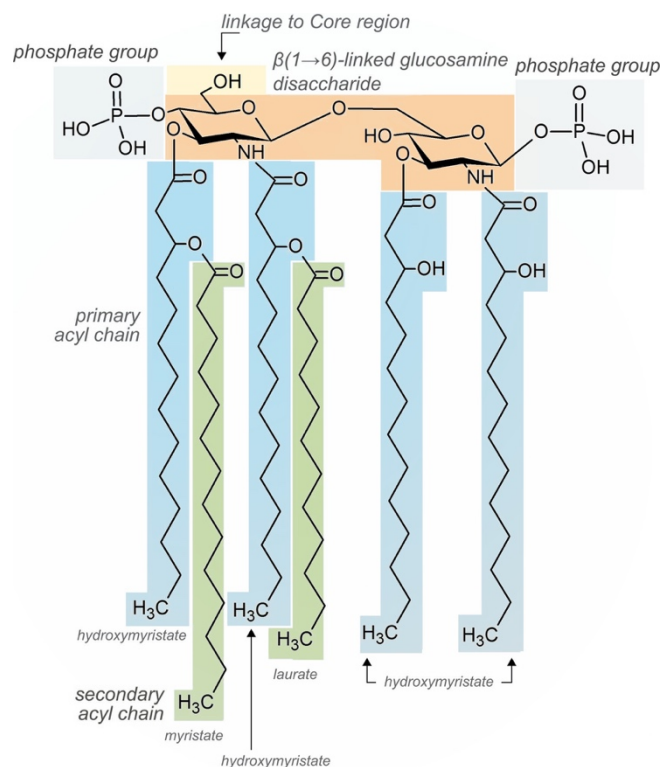
Les LPS sont des constituants de la membrane des bactéries à Gram négatif. Ces bactéries présentent une double membrane cellulaire : le double feuillet phospholipidique interne délimite le cytoplasme et le double feuillet externe permet l'ancrage de protéines et de molécules nécessaires à l'interaction de la bactérie avec le milieu extérieur. La couche externe contient ainsi de nombreuses molécules de LPS qui participent à la stabilisation de la membrane et à la protection de la bactérie contre les agressions extérieures (antibiotiques, détergents...) **(113)**.



**Figure 1 – La structure générale des LPS se compose d'un lipide et d'une chaîne oligosaccharidique.** Le lipide A est la partie intra-membranaire du LPS. Il s'agit d'un dissaccharide de glucosamines phosphorylés et acylés par un nombre variable d'acides gras. Le noyau est divisé en deux parties : le noyau interne largement conservé contient des résidus kéto-déoxyoctanate et heptose, le noyau externe plus variable contient des hexoses. L'antigène O est le fragment variant le plus fortement entre les espèces. Il se compose de répétitions de plusieurs polysaccharides appelés chaînes O. Adapté de : Erridge et *al.*, 2002 **(114)**

La structure générale des LPS peut être divisée en trois segments : le lipide A, le noyau oligosaccharidique (ou « core ») et l'antigène O (**Figure I**) (**115**).

- Le lipide A est hydrophobe et assure l'ancrage de la molécule dans la membrane bactérienne. Sa structure est conservée entre les différentes espèces à Gram négatif et comprend généralement un disaccharide acylé par un nombre variable de chaînes d'acides gras. Le lipide A du LPS d'*E. coli*, le plus décrit, est constitué de deux glucosamines phosphorylées et acylées par 4 chaînes d'hydroxymyristate (14 carbones, C<sub>14</sub>). Ces chaînes primaires sont estérifiées de manière asymétrique par une chaîne myristate (C<sub>14</sub>) et une chaîne laurate (C<sub>12</sub>) (**Figure J**). Le lipide A porte l'activité biologique du LPS, il est nécessaire et suffisant pour lui conférer son immunogénicité (**116**).



**Figure J – Le lipide A du LPS d'*E. coli* correspond à un disaccharide de glucosamines hexaacylées.** Le squelette saccharidique (orange) porte un groupement hydroxyle (jaune) qui permet la liaison avec le noyau et deux groupements phosphates (gris). Il est acylé par 4 chaînes primaires d'hydroxymyristate (bleu), deux d'entre elles sont estérifiées par des chaînes secondaires (vert) de myristate et de laurate. Source : Steimle et al., 2016 (**115**)

- Le noyau oligosaccharidique correspond à la jonction entre les parties intra-membranaire et extra-membranaire. Ainsi, on peut distinguer un noyau interne, plutôt hydrophobe, et un noyau externe, plutôt hydrophile. Le noyau interne est composé d'un nombre variable de résidus kéto-déoxyoctanate (KDO) et d'une



chaîne glucidique (généralement trois heptoses). Le noyau externe est plus variable entre les espèces, il est la plupart du temps composé d'une chaîne de D-glucose, de D-galactose et/ou de D-glucosamine.

- L'antigène O est la partie la plus externe du LPS et possède un caractère hydrophile. Il est constitué par des répétitions (jusqu'à 50) de chaînes polysaccharidiques très variables, tant en termes de longueur que de composition. La couche de polysaccharides formée par les antigènes O à la surface de la bactérie assure sa protection, à la manière du glycocalix autour des cellules eucaryotes. La composition de l'antigène O varie en fonction de l'environnement de la bactérie, c'est pourquoi on distingue plusieurs sérotypes pour une même espèce. On dénombre 180 sérotypes pour *E. coli* avec des différences entre les souches entéro-pathogéniques et uro-pathogéniques par exemple (117).

#### **b. Modifications de structure inter-bactériennes**

La structure du LPS est plus ou moins conservée entre les espèces. En plus de la variabilité introduite par les combinaisons de répétitions de l'antigène O, des variations légères dans la structure du lipide A peuvent modifier l'immunogénicité du LPS. On distingue les LPS agonistes, qui entraînent une forte réaction inflammatoire, les LPS agonistes faibles, provoquant une réponse plus modérée et les LPS antagonistes qui bloquent les effets des deux premières catégories en occupant leurs récepteurs de signalisation (115).

Il a été montré que les variations de structures du lipide A des LPS de différentes entérobactéries leur conféraient un pouvoir immunostimulant plus ou moins important. Par exemple, la stimulation de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ou de monocytes par les LPS d'*E. coli* ou d'*Akkermansia mucinophila* provoque un fort relargage de cytokines pro-inflammatoires (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) de manière dose dépendante, tandis que la stimulation par les LPS de *Bacteroides dorei* ou *vulgatus* ne semble pas activer les cellules. De plus, lorsque les cellules sont prétraitées avec le LPS de *B. dorei*, les réponses inflammatoires induites par le LPS d'*E. coli* sont inhibées (118).

Les variations de structure du lipide A concernent principalement le nombre et la longueur des chaînes acyles car elles influencent la fixation des LPS sur leur PRR spécifique TLR4 (cf. § Détection par les TLR). La forme la plus couramment décrite chez les entérobactéries est hexaacylée et possède le plus haut potentiel immunostimulant (119). Aussi, plus le nombre de groupes phosphates porté par le disaccharide est faible, plus l'immunogénicité du LPS diminue et moins la bactérie est sensible aux AMP (120). Les différences de structure du lipide A peuvent être introduites au moment de sa synthèse dans le cytosol des bactéries ou par l'action d'hydrolases et de phosphatases. Ces enzymes sont exprimées par l'hôte (comme l'acyloxyacyl hydrolase [AOAH] qui inactive les LPS en retirant les chaînes acyles) ou par les bactéries elles-mêmes (comme la 1- et la 4'-lipid A phosphatase de *Porphyromonas gingivalis*). Dans ce dernier cas, la modification de structure du lipide A permet à la bactérie de s'adapter à son environnement et notamment d'échapper au système immunitaire (121).

## 2. Techniques de quantification des LPS

A l'heure actuelle, aucune technique de détection des LPS ne permet de combiner la mesure de leur quantité absolue et de leur activité endotoxinique, c'est-à-dire leur capacité à activer les cellules immunitaires. Il n'existe pas de consensus pour la quantification des LPS dans les fluides biologiques. Celle-ci nécessite des précautions particulières compte tenu de la labilité des LPS (capacités d'agrégations dépendantes des conditions physico-chimiques, rétention dans les caillots sanguins...) et du risque de contamination par des LPS de l'environnement ou par des agonistes non-LPS. La **Table F** présente une liste non exhaustive des différentes techniques pouvant permettre la quantification des LPS.

Technique	Type de dosage	Principe	Avantages	Inconvénients
<b>Test LAL (pour <i>Limulus Amebocyte Lysate</i>)</b>	Activité	Le sang de <i>Limulus polyphemus</i> possède la capacité de coaguler en présence d'endotoxines (122) via l'activation d'une proenzyme. Cette réaction a été détournée pour produire une coloration proportionnelle à la quantité de LPS actif présent dans l'échantillon.	Méthode de référence Rapidité	Pas de reflet de l'activité <i>in vivo</i> car ne dépend pas de l'activation de PRR Inhibition de la réaction par des composants sériques (albumine...) Faux positifs (autres polysaccharides) Tend à disparaître (développement de méthodes alternatives utilisant des enzymes recombinantes)
<b>EAA (pour <i>Endotoxin activity assay</i>)</b>	Activité	La capacité de complexes LPS-anticorps à stimuler la production de ROS par les neutrophiles est mesurée par chimioluminescence.	Sensibilité élevée Peu sensible aux inhibiteurs	Spécificité des anticorps ne permet pas de détecter l'ensemble des LPS Pas de reflet de l'activité <i>in vivo</i> car ne dépend pas de l'activation de PRR Nécessite l'utilisation d'échantillons frais
<b>Méthodes cellulaires</b>	Activité	Des macrophages ou des cellules reportrices (de type HEK-293-TRL4) sont cultivées en présence de l'échantillon à doser. La réponse inflammatoire des macrophages ou l'activité reportrice des cellules HEK sont proportionnelles à la quantité de LPS dans l'échantillon.	Reflet de l'activité <i>in vivo</i> car dépend de l'activation de PRR Peut être utilisé pour détecter la présence de LPS antagonistes	Nécessite une étape de culture cellulaire Peu sensible Inhibition de la réaction par des composants sériques Faux positifs (agonistes des autres TLR)
<b>ELISA</b>	Quantité absolue	Des anticorps anti-antigène O sont utilisés pour détecter la présence de LPS dans l'échantillon à l'aide d'une réaction immuno-enzymatique colorimétrique.	Rapidité Sensibilité élevée Peu sensible aux inhibiteurs	Spécificité des anticorps ne permet pas de détecter l'ensemble des LPS Pas de reflet de l'activité <i>in vivo</i> car ne dépend pas de l'activation de PRR
<b>Spectrométrie de masse – exemple : technique Endoquant® (123)</b>	Quantité absolue	Les chaînes acyles caractéristiques du lipide A des LPS sont hydrolysées puis détectées par spectrométrie de masse.	Évite l'utilisation de LAL ou d'anticorps Peu sensible aux inhibiteurs Peut permettre l'identification des types de lipides A en fonction de la longueur des chaînes acyles	Biais possible par les acides gras hydroxylés par les cellules de l'hôte Peu sensible Pas de reflet de l'activité <i>in vivo</i> car ne dépend pas de l'activation de PRR

**Table F – Plusieurs techniques de quantification des LPS se basent sur la mesure de leur activité (capacité à activer les cellules immunitaire) ou sur leur quantification absolue.** Toutefois, aucune technique n'est idéale pour rendre compte de la présence de LPS, c'est pourquoi l'utilisation de plusieurs méthodes complémentaires est conseillée pour détecter les LPS dans les fluides biologiques. D'après : Faraj et al., 2017 (124)

### 3. Détection des LPS et activation de la réponse immunitaire

Les LPS peuvent se retrouver dans la circulation générale après le franchissement des barrières épithéliales (soit directement sous forme de LPS, soit après lyse ou division des bactéries transloquées). Les LPS peuvent être reconnus directement au niveau de la circulation générale par la voie alterne du complément ou au niveau cellulaire par le TLR4 ou par certaines caspases.

#### a. Interaction des LPS avec le système du complément

Le système du complément est un mécanisme de défense de l'immunité innée contre les infections. Il intervient dans l'élimination des agents pathogènes et des complexes immuns, mais également dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Le complément est un ensemble de protéines synthétisées par le foie, circulant dans le plasma et activées par des cascades de protéolyse.

Les LPS peuvent stimuler la voie dite alterne d'activation du complément et provoquer l'opsonisation, c'est-à-dire le recouvrement, de la bactérie. Ils peuvent également favoriser la formation d'un pore à la surface de la cellule cible (complexe d'attaque membranaire) et entraîner sa lyse osmotique. Les protéines du complément fixées sur la bactérie participent aussi à la phagocytose, à la présentation de l'antigène et à la modulation de la réponse des cellules immunitaires. Ainsi, la reconnaissance des LPS bactériens par le système du complément constitue une première ligne de reconnaissance et de défense par le système immunitaire de l'hôte. Les variations de structures des LPS, notamment de l'antigène O, modifient la reconnaissance des bactéries par le système du complément (125).

#### b. Détection par les TLR

Les LPS sont détectés au niveau cellulaire par leur PRR spécifique, TLR4, après avoir été délivrés par une chaîne de cofacteurs. Le complexe TLR4-MD2 ne peut reconnaître directement les LPS car, de par leur caractère amphiphile, ils circulent sous forme de micelles ou de vésicules peu accessibles. Ainsi, les molécules de LPS doivent être individualisées et adressées par la *LPS binding protein* (LBP) et le cofacteur CD14 (Figure K).

### i. Transfert du LPS vers TLR4

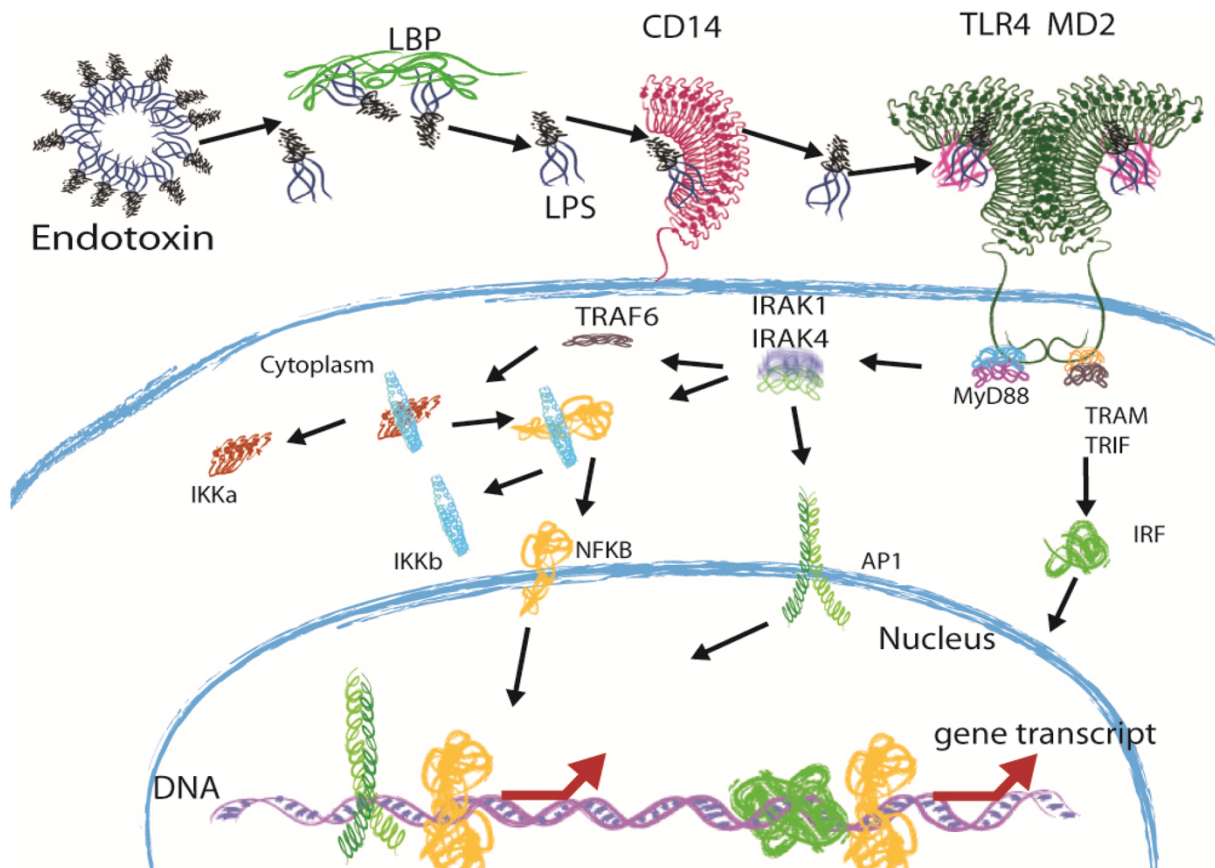
La partie hydrophobe du LPS est ancrée dans la membrane bactérienne ou dissimulée à l'intérieur de micelles. Elle doit être transférée dans la poche hydrophobe de MD2 pour rester intacte. La LBP, une glycoprotéine sérique d'environ 60 kDa, est le premier acteur de ce transfert. Elle forme un complexe de haute affinité avec une molécule de LPS puis la délivre au cofacteur CD14. CD14 peut être membranaire, ancré dans la bicouche lipidique des cellules myéloïdes, ou soluble dans le plasma. Cette seconde forme autorise les cellules dépourvues de CD14 membranaire (cellules non immunitaires) à répondre au LPS **(126)**. CD14 délivre ensuite la molécule de LPS au complexe TLR4-MD2, exprimé à la surface des cellules myéloïdes et de cellules non immunitaires (cellules endothéliales, cellules épithéliales...). La partie lipidique du LPS est reçue dans une poche hydrophobe de MD2 tandis que la partie hydrophile interagit avec TLR4. Cette liaison provoque la dimérisation de deux molécules de TLR4 **(127)**. Les différentes structures de LPS n'activent pas avec la même intensité cette cascade et provoquent des réponses spécifiques. Toutefois, les mécanismes mis en jeu ne sont pas entièrement élucidés. La structure du LPS pourrait influencer l'affinité de la LBP et de CD14, la capacité de transfert de CD14 vers MD2 ou encore la dimérisation de TLR4-MD2 **(128)**. Par exemple, il est connu que les LPS hexaacylés sont particulièrement immunogènes car l'une des chaînes acyles reste à l'extérieur de la poche hydrophobe de MD2 et interagit avec TLR4 **(129)**.

### ii. Signalisation intracellulaire

La dimérisation de TLR4 induit une cascade de signalisation en recrutant, *via* les domaines TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) intracellulaires, deux protéines : MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) et TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$* ) ainsi que leurs adaptateurs spécifiques, respectivement TIRAP (*TIR-domain containing adaptor protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) **(130)**.

La fixation de MyD88 sur le complexe TLR4-TIRAP induit le recrutement des protéines IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) et TRAF (*TNF receptor associated factor*). Ces effecteurs activent les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) et AP1 (*Activator protein 1*) par les cascades de phosphorylation dépendantes des I $\kappa$ B kinases (IKK) et des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), respectivement. Le complexe MyD88-TIRAP se dissocie ensuite du domaine TIR, provoquant

l'internalisation du complexe TLR4-MD2-LPS dans des endosomes. Des études récentes suggèrent que la fixation de TRIF-TRAM se produirait exclusivement au niveau de ces endosomes, après la libération des domaines TIR (**131**). La fixation de TRIF-TRAM entraîne l'activation du facteur de transcription IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) (**Figure K**).



**Figure K – La liaison des LPS sur leur récepteur spécifique TLR4 se déroule en trois étapes :** i) Les molécules de LPS sont reconnues par la *LPS Binding Protein* (LBP) qui ii) assure leur transfert vers le corécepteur CD14. iii) CD14 délivre ensuite le LPS à un complexe TLR4-MD2, provoquant sa dimérisation et une cascade de signalisation intracellulaire. Le changement de conformation de TLR4 recrute deux protéines intracellulaires : MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) et TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$* ) ainsi que leurs adaptateurs spécifiques, TIRAP (*TIR-domain containing adaptor protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), respectivement. Les voies de signalisation sous-jacentes aboutissent à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*) et AP1 (*Activator protein 1*) pour la voie MyD88/MAL et IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) pour la voie TRIF/TRAM. Source : Nijland et al., 2014 (**130**)

NF- $\kappa$ B et AP1 induisent l'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-6 tandis qu'IRF3 induit l'expression du gène codant l'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) **(131)**. L'activation de TLR4 peut également induire la production de ROS, d'oxyde nitrique (NO) et d'AMP en fonction du type cellulaire impliqué **(115)**. Ces composés participent aux mécanismes de défense contre les infections bactériennes.

### c. Détection par les caspases

Une autre voie de détection du LPS par les cellules de l'hôte a été mise en évidence dans les années 2000, principalement dans les macrophages. Cette voie met en jeu les caspases inflammatoires 4 et 5 chez l'homme et 1, 4, 5 et 11 chez la souris. Ces enzymes sont synthétisées comme des zymogènes et activées par un clivage protéolytique. La cascade de signalisation aboutit à la formation et à l'activation de l'inflammasome, complexe multi-protéique impliqué dans la réponse inflammatoire **(132)**.

La détection du LPS fait intervenir la voie non-canonique d'activation et nécessite un premier signal. Cet évènement initiateur peut être la détection de LPS extracellulaire par le TLR4, mais aussi l'activation des TLR2, 3 ou 7 par d'autres composants bactériens **(133)**. L'expression des composants de l'inflammasome caspase-1, NRLP3, ASC (*Apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) et caspase-11 est alors amplifiée. Le LPS cytoplasmique peut être détecté directement par la caspase-11 et induire la formation et l'activation de l'inflammasome **(134)**. L'inflammasome clive et active les pro-cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 et/ou entraîne la mort de la cellule par pyroptose. Les composants cellulaires sont libérés dans le milieu extracellulaire après perforation de la membrane plasmique par la gasdermine D. Ainsi, cette mort cellulaire, bien que « programmée », est extrêmement immunogène (libération de DAMP). La pyroptose des phagocytes participe à la mise en place de l'inflammation permettant de lutter contre les pathogènes **(135)**.

Les voies par lesquelles le LPS est exposé à la caspase-11 dans le cytoplasme restent à déterminer. Si le LPS peut entrer directement dans les cellules avec le reste de la bactérie dans le cas des souches intracellulaires, il pourrait s'agir de l'internalisation

de vésicules bactériennes ou de l'intervention de la LBP dans le cas des souches extracellulaires (136). Il semblerait par ailleurs que cette voie de détection ne soit pas seulement une alternative à la signalisation par le TLR4, mais qu'elle constitue un mécanisme de modulation des réponses immunitaires. La détection par les caspases limite notamment l'échappement des bactéries.

## 4. LPS et GVHa

### a. Exposition au LPS au cours de la GVHa

Le LPS franchissant les barrières intestinales lésées a été rapidement incriminé dans les mécanismes physiopathologiques de la GVHa. Dès les années 1990, plusieurs équipes ont en effet démontré l'accumulation de LPS dans l'organisme de souris allogreffées (92,110). Dans ces travaux, l'augmentation du taux de LPS est détectée dans le foie, la rate et la circulation générale à l'aide de la technique LAL. Cette exposition participe à l'initiation et à l'entretien de l'orage cytokinique caractéristique de la GVHa en provoquant le relargage de grandes quantités de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (137).

Les travaux de l'équipe de Lapp démontrent par ailleurs que la GVHa favorise la réponse des macrophages à l'injection de LPS : les macrophages issus de souris allogreffées sécrètent davantage de TNF- $\alpha$  en réponse à une stimulation LPS par rapport à des macrophages issus de souris naïves (138). Il est possible que ce mécanisme mette en jeu la notion d'amorçage du LPS : une première stimulation par le LPS (particulièrement une faible dose) peut potentialiser la réponse lors d'une seconde rencontre et provoquer une réponse inflammatoire très puissante (139). Néanmoins, ce mécanisme n'est pas formellement décrit au cours de la GVHa et il reste à déterminer si le premier stimulus résulte de l'exposition préalable du donneur de cellules hématopoïétiques (111) ou d'évènements précoces de perméabilisation de l'épithélium intestinal chez le receveur.

D'autre part, le LPS pourrait intervenir dans le recrutement et l'activation des neutrophiles en réponse à la translocation bactérienne au cours de la GVHa



intestinale. Les polynucléaires neutrophiles contribuent aux lésions tissulaires en libérant des ROS et en participant à l'activation des LT alloréactifs. Lorsque les neutrophiles greffés aux souris receveuses sont dépourvus de TLR4 (TLR4 KO pour *knock-out*), la sévérité de la maladie est diminuée **(35)**.

### **b. Approches thérapeutiques**

La découverte du rôle du LPS dans l'initiation et le maintien des réponses allogéniques a encouragé la recherche de stratégies pour limiter son impact. Ainsi, l'équipe de Ferrara a démontré que l'utilisation d'un antagoniste synthétique du lipide A (le composé B975) permettait de réduire la sévérité de la GVHa au regard de la mortalité, du score clinique et des lésions histologiques des souris traitées **(140)**. Plus récemment, l'équipe d'Ellison s'est intéressé à la modulation de la sensibilité au LPS en réintroduisant le microARN-146a chez les souris receveuses. Ce microARN, sous-exprimé au cours de la GVHa, est notamment impliqué dans la régulation et la résolution de l'inflammation après exposition au LPS. Toutefois, cette stratégie n'offre qu'une protection très partielle **(141)**.

Par ailleurs, il apparaît que tant la voie du TLR4 que la voie de la caspase-11 sont impliquées dans la détection du LPS au cours de la GVHa, car leur inactivation par KO atténue la sévérité de la maladie dans des modèles murins **(142,143)**. De la même façon, l'absence ou l'inhibition de MyD88, qui est l'un des effecteurs intracellulaires de TLR4, limite l'évolution de la GVHa tout en préservant l'effet GVL **(144,145)**. La coexistence de ces deux voies pourrait expliquer les résultats partiels observés. Des données obtenues dans une petite cohorte de patients montrent que les polymorphismes (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) de TLR4 présentes chez le donneur ou le receveur semblent protéger les patients allogreffés du développement d'une GVHa, mais qu'elles favorisent la susceptibilité aux infections bactériennes **(146)**.

Ainsi, si l'implication du LPS dans la physiopathologie de la GVHa est bien décrite, aucune approche thérapeutique translationnelle n'a découlé de ces travaux à ce jour. Par ailleurs, si le blocage ou l'inhibition d'une des voies de détection du LPS peut apporter une solution partielle, il semble que la neutralisation totale de l'activité endotoxinique puisse mener à de meilleurs résultats.

## V. Inactivation et élimination des LPS circulants

Les organismes susceptibles aux infections par des bactéries à Gram négatif ont développé des mécanismes de défense spécifiques. Les voies de détection décrites dans la section précédente permettent d'enclencher la réponse du système immunitaire et d'engager les mécanismes de lutte contre le pathogène. Toutefois, d'autres mécanismes sont essentiels pour assurer sa neutralisation et son élimination, et ainsi permettre la résolution de l'inflammation. L'un de ces processus fait intervenir le métabolisme des lipides.

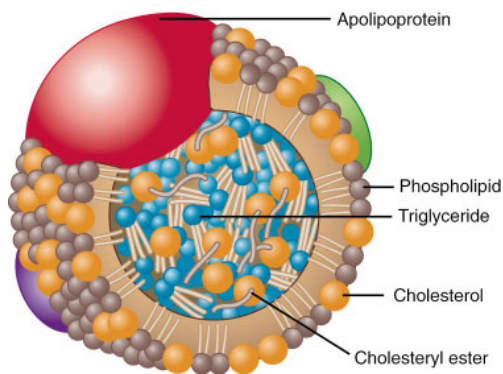
Des liens entre métabolisme des lipides et immunité innée ont été récemment mis en évidence. Les mécanismes de prise en charge des lipides dérivés des microorganismes semblent indissociables de ceux des lipides endogènes. Cette similitude est sans doute due à une évolution commune (147). La structure et le caractère amphipathique des LPS sont similaires à certains phospholipides humains (comme l'acide phosphatidique ou les céramides) et des analogies dans la liaison et la circulation de ces molécules ont été décrites (148). Ainsi, il existe un chevauchement des voies de transport des LPS avec les voies métaboliques du cholestérol impliquant les lipoprotéines circulantes.

### 1. Métabolisme des lipoprotéines circulantes

#### a. Différentes classes de lipoprotéines

Les lipides sont transportés dans l'organisme par des lipoprotéines circulantes : les chylomicrons, les VLDL (*Very light density lipoproteins*), les IDL (*Intermediate density lipoproteins*), les LDL (*Light density lipoprotein*) et les HDL (*High density lipoproteins*). Ces lipoprotéines sont des complexes globulaires hydrosolubles de protéines et de lipides permettant d'émulsifier ces derniers dans les fluides biologiques. La couche externe est composée de phospholipides et de cholestérol libre, dont les portions les plus hydrophobes sont orientées vers l'intérieur de la structure. La couche externe contient également les apolipoprotéines spécifiques de chaque type de transporteurs.

Elles organisent et stabilisent l'agencement des lipides et confèrent une identité fonctionnelle aux particules, permettant leur adressage dans l'organisme. Le cœur des lipoprotéines contient des triglycérides, des esters de cholestérol et des molécules hydrophobes (comme les vitamines liposolubles) en petite quantité (**Figure L**).



**Figure L – La structure générale des lipoprotéines s'organise autour d'une apolipoprotéine.** La couche externe est composée de phospholipides amphipatiques et de cholestérol libre. Le cœur de la particule contient des triglycérides, des esters de cholestérol et éventuellement d'autres molécules hydrophobes (vitamines liposolubles). Source : Genest et *al.*, 2003 (**149**)

On distingue les différentes lipoprotéines en fonction de leur densité, mais elles présentent également des compositions, des tailles et des rôles différents (**150**) résumés dans la **Table G**.

- Les chylomicrons transportent principalement des triglycérides exogènes de l'intestin vers les tissus périphériques de stockage (tissu adipeux) ou de consommation (muscles, myocarde). Ils assurent également le transport du cholestérol alimentaire sous forme estérifiée de l'intestin vers le foie.
- Les VLDL sont sécrétées par les hépatocytes à partir des acides gras libres de la circulation et des acides gras synthétisés *de novo* par le foie. Elles contiennent principalement des triglycérides et des esters de cholestérol qui sont distribués aux tissus périphériques. Les particules sont progressivement déchargées de leurs lipides et passent au statut d'IDL puis de LDL (augmentation de la densité). Ces dernières sont ensuite captées de nouveau par le foie pour être rechargées en lipides.
- L'enveloppe des HDL est riche en phosphatidylcholine et elles transportent principalement du cholestérol sous forme estérifiée des tissus périphériques vers le foie. On parle de transport inverse du cholestérol.

Lipoprotéine	Densité	Taille (nm)	Apolipoprotéines principales	Rôle majeur
<b>Chylomicron</b>	< 0,95	80 – 1200	B-48, A-I, A-II, C, E	Transport des lipides alimentaires
<b>VLDL</b>	0,95 – 1,006	35 – 80	B-100, C, E	Transport des lipides depuis le foie
<b>IDL</b>	1,006 – 1,019	27 – 30	B-100, C, E	Transport des lipides depuis le foie
<b>LDL</b>	1,019 – 1,063	22 – 27	B-100	Transport des lipides vers les tissus périphériques
<b>HDL</b>	1,063 – 1,25	7 – 13	A-I, A-II, C, E	Extraction et transport des lipides des tissus périphériques vers le foie

**Table G – Les différentes classes de lipoprotéines** se distinguent par leur densité, leur taille, leur apolipoprotéine principale et leur rôle. D'après : Thaxton et *al.*, 2016 (151)

### b. Focus sur les HDL et le transport inverse du cholestérol

L'élimination du cholestérol périphérique excédentaire est assurée par le transport inverse du cholestérol (RCT pour *Reverse cholesterol transport*). Le cholestérol est mobilisé des tissus périphériques, passe dans la circulation générale (*via* les lipoprotéines) pour atteindre le foie et être éliminé par voie biliaire dans les fèces. Le transport sanguin du cholestérol est assuré principalement par les HDL.

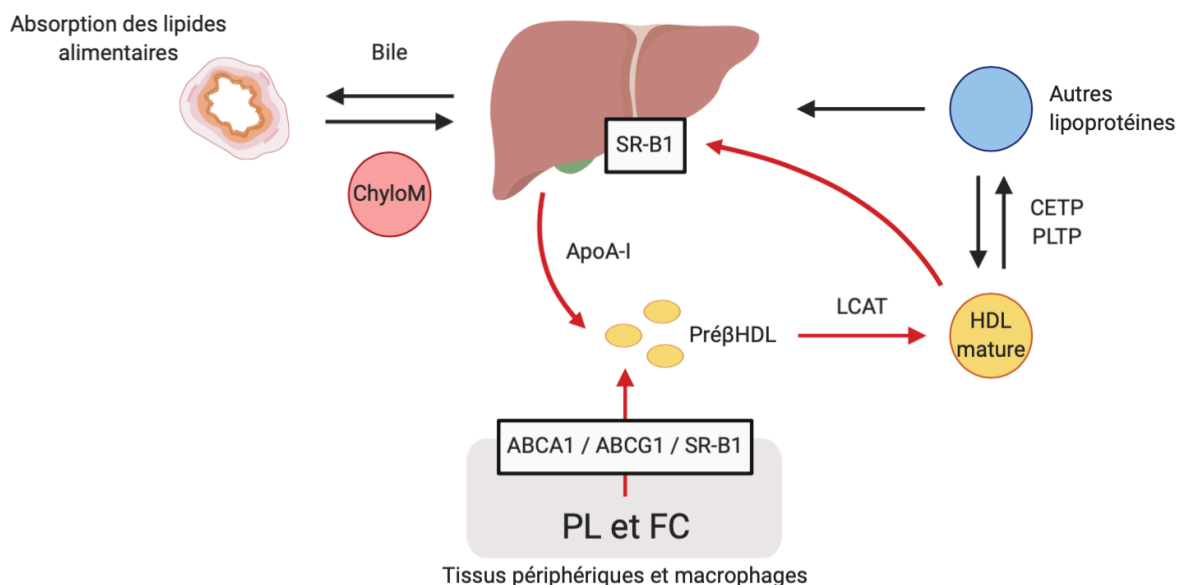
La forme naissante discoïdale des HDL (préβHDL) est composée d'apolipoprotéine A-I (APOA-I) produite par le foie et de quelques phospholipides. Les particules sont ensuite libérées dans la circulation générale. L'efflux du cholestérol des cellules périphériques ou des macrophages spumeux vers les HDL pauvres en lipides fait intervenir les *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), *G1* (ABCG1) et le *scavenger receptor class B type 1* (SR-BI). Ces protéines, enchâssées dans la membrane plasmique des cellules donneuses, assurent le rapprochement des HDL et le transfert de cholestérol libre (non estérifié) (152).

La maturation des HDL est assurée par l'action de la LCAT (*lecithin-cholesterol acyltransferase*) plasmatique qui transfère un acide gras sur une molécule de cholestérol en présence de APOA-I. Devenu totalement insoluble, le cholestérol estérifié migre vers le cœur de la particule qui devient une HDL mature sphérique (αHDL2) (153).

Les HDL matures sont ensuite remodelées par différentes enzymes :

- La CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*) catalyse le transfert d'esters de cholestérol des  $\alpha$ HDL vers les particules riches en APOB (VLDL, IDL et LDL) en échange de triglycérides **(154)**. Cette enzyme est absente chez les rongeurs.
- La lipase hépatique hydrolyse les triglycérides du cœur des  $\alpha$ HDL2 et la lipase endothéliale hydrolyse quant à elle les phospholipides de surface. Ces réactions déstabilisent la particule qui se dissocie en HDL mature de plus petite taille ( $\alpha$ HDL3) et en pré $\beta$ HDL **(153)**.
- La PLTP (*Phospholipid transfer protein*) peut assurer le transfert de phospholipides entre différents types de lipoprotéines, mais elle semble surtout impliquée dans l'intégration de composés amphipatiques dans les HDL. Ainsi, des activités de transfert de la vitamine E **(155)** ou des LPS **(156)** lui ont été attribuées.

Les HDL sont finalement captées par le foie, ce qui constitue l'ultime étape du RCT. La voie principale fait intervenir le récepteur SR-BI hépatique qui transfère le cholestérol libre ou estérifié aux hépatocytes. Une autre voie indépendante de SR-BI, plus récemment décrite, implique la fixation d'APOA-I à la surface des cellules hépatiques exprimant une forme ectopique de la chaîne  $\beta$  de l'ATP synthase **(157)**. Cette liaison entraîne l'endocytose de la particule. Ses composants, principalement le cholestérol, peuvent être recyclés par la voie ABCA1 pour redonner de nouvelles lipoprotéines ou être sécrétés dans la bile. Les molécules d'APOA-I non chargées en lipides sont éliminées par voie rénale **(152)** **(Figure M)**.



**Figure M – La voie (simplifiée) de transport inverse du cholestérol (RCT)** est représentée par les flèches rouges. Elle correspond au prélèvement des lipides (phospholipides [PL] et cholestérol libre [FC]) des tissus périphériques et des macrophages spumeux par la forme naissante des HDL riches en APOA-I : les préβHDL. Ces particules sont ensuite remodelées en HDL matures qui sont captées de nouveau par le foie. Le RCT est connecté au reste du métabolisme des lipides, notamment avec les autres lipoprotéines *via* l'action de la CETP et de la PLTP. D'après : Murch *et al.*, 2007 (158)

## 2. Neutralisation par le transport inverse des LPS

La structure amphipatique des LPS est homologue à celle des lipides endogènes, ce qui leur confère la capacité de se lier à toutes les lipoprotéines. Toutefois, ils se fixent principalement sur les HDL. Ainsi, l'incubation d'une concentration connue de LPS avec du sang humain total aboutit à la complexation d'environ 60% du LPS avec les HDL (159). Cette liaison fait intervenir la famille des protéines de transfert de lipides et de liaison au LPS (LT/LBP pour *lipid transfer/lipopolysaccharide binding proteins*). Le LPS complexé est moins immunogène et il est véhiculé vers le foie par la voie du transport inverse du LPS (RLT pour *reverse LPS transport*) (160) (Figure N).

### a. Prise en charge par la famille des LT/LBP

De la même façon que pour les lipides endogènes, le transfert du LPS à partir de micelles circulantes, de la surface des bactéries ou de la membrane des monocytes

activés nécessite l'intervention de navettes de la famille des LT/LBP. Ce groupe comprend la CETP, la PLTP, la LBP et la BPI (*bactericidal permeability increasing protein*). Ces membres partagent une homologie de structure et une capacité de transfert des molécules lipidiques **(161)**.

- La CETP et la PLTP participent au RLT et catalysent l'échange entre lipoprotéines de cholestérol estérifié et de phospholipides, respectivement (cf. § V.1.b.).
- La LBP participe à la cascade de transfert du LPS jusqu'au TLR4 (cf. § IV.3.c.).
- La BPI possède une forte affinité pour le lipide A du LPS et exerce une action directe sur la bactérie **(162)**. Le lipide A étant enchâssé dans la membrane, la simple liaison de la BPI déstabilise la bicouche lipidique et stoppe la croissance bactérienne. Elle forme ensuite des pores qui induisent la lyse osmotique de la bactérie **(163)**.

Tous les membres de la famille LT/LBP ne semblent pas impliqués dans le RLT. Ainsi, aucune liaison de la CETP au LPS et aucune activité de transfert des LPS sur les lipoprotéines par la BPI n'ont été rapportées à ce jour. La LBP et la PLTP semblent donc être les seules protéines à participer activement au RLT.

La LBP peut ainsi, en plus de son activité pro-inflammatoire de délivrance du LPS au CD14, favoriser sa fixation sur les lipoprotéines. L'équipe de Wright a démontré que la LBP pouvait être portée par les HDL et qu'elle agirait alors comme un cofacteur de neutralisation des LPS **(164)**. Par ailleurs, il a été suggéré que la forme soluble de CD14 puisse également participer à ce transfert, permettant notamment l'extraction de LPS présenté à la surface des monocytes activés vers les lipoprotéines **(165,166)**.

Les deux fonctions contradictoires de la LBP, pro- et anti-inflammatoires, semblent dépendre de sa concentration plasmatique. En effet, la LBP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, c'est-à-dire que sa synthèse hépatique est augmentée en réponse à une inflammation. On peut ainsi doser jusqu'à 12 fois plus de LBP circulante en cas d'infection bactérienne par exemple **(164)**. La concentration de LBP dans le plasma influence sa cinétique d'interaction avec les LPS, CD14 et les cellules de l'immunité innée et détermine le devenir du LPS auquel elle est complexée **(167)**.

La PLTP participe également au transfert des LPS vers les lipoprotéines mais, contrairement à la BPI, elle n'est pas capable de les adresser au CD14. Son action serait donc uniquement anti-inflammatoire **(156)**. *In vivo*, le défaut d'activité PLTP accroît la susceptibilité au sepsis. L'injection de LPS chez des souris PLTP KO provoque une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires et une hausse de la mortalité, associées à une diminution du transfert des LPS vers les lipoprotéines **(168)**. A l'inverse, le renforcement de l'activité par l'injection de PLTP recombinante protège les souris de l'injection de LPS et du sepsis induit par ligature-ponction du caecum **(169)**.

#### **b. Neutralisation de l'activité endotoxinique par les HDL**

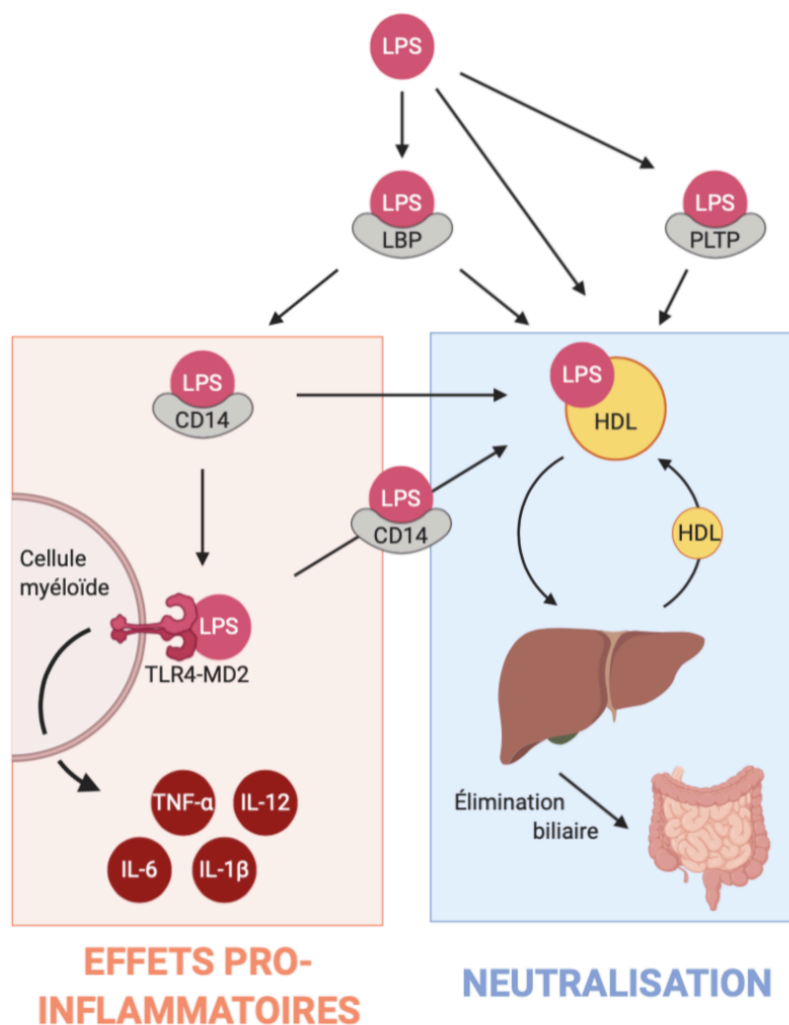
La liaison du LPS aux lipoprotéines entraîne une neutralisation de son activité endotoxinique **(170)**. Le LPS complexé a ainsi une capacité d'activation des monocytes 20 à 1000 fois inférieure à celle de la forme libre, limitant la production d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Liés aux lipoprotéines, les LPS sont moins aptes à se lier à la surface des monocytes et donc à leur récepteur TLR4 **(171)**.

Le masquage de l'activité endotoxinique pourrait s'expliquer par la dissimulation du lipide A ou par la rigidification de ces chaînes acyles lorsque le LPS est complexé aux HDL **(172)**. Ainsi, la liaison du LPS le rendrait inaccessible aux cellules immunitaires ou modifierait ses capacités de liaison dépendantes des chaînes acyles. C'est principalement la structure du lipide A qui module le pouvoir de neutralisation en modifiant les cinétiques d'interaction avec les lipoprotéines **(159)**. Par exemple, à concentrations égales, les LPS issus de méningocoques sont moins bien neutralisés *in vitro* que les LPS issus d'*E. coli* **(173)**.

Il est par ailleurs important de relever que les capacités de masquage de l'activité des endotoxines par les lipoprotéines sont fortement diminuées au cours des syndromes inflammatoires. Levels et son équipe ont ainsi montré que la composition des lipoprotéines était modifiée par le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). Les concentrations plasmatiques et lymphatiques en APOA-I, APOB et cholestérol total sont effondrées chez les patients présentant un SIRS par rapport au groupe contrôle. De plus, la capacité de neutralisation des LPS semble altérée chez ces patients et les LPS se retrouvent majoritairement liés aux LDL plutôt qu'aux HDL **(174)**.



Deux voies de prise en charge des LPS coexistent ainsi dans l'organisme et sont schématisées dans la **Figure N**. Plusieurs acteurs sont communs entre les deux voies (LBP, CD14...) et favorisent tantôt une signalisation pro-inflammatoire *via* le TLR4 des monocytes/macrophages, tantôt une neutralisation anti-inflammatoire par les lipoprotéines circulantes. Lors d'une réponse immunitaire normale à une infection, cette balance participe à la mise en place d'une réaction inflammatoire suffisante à l'élimination du pathogène, puis à un retour à l'homéostasie. En revanche, lors d'une hyper-activation du système immunitaire, comme cela peut être le cas au cours de la GVHa, il est possible que ces mécanismes soient perturbés et produisent une réponse inflammatoire soutenue et pathologique.



**Figure N– Les LPS circulants peuvent être pris en charge par deux voies antagonistes et interconnectées.** Leur détection par le PRR spécifique TLR4 couplé à MD2 à la surface des cellules myéloïdes – mais également de quelques cellules lymphoïdes – entraîne une cascade de signalisation. Elle aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui participent à l'entretien de la réponse immunitaire. D'autre part, les LPS peuvent être incorporés dans les lipoprotéines, particulièrement les HDL, pour être transportés vers le foie par le transport inverse du LPS. Les LPS sont ensuite excrétés dans la bile. D'après : Murch *et al.*, 2007 (158), Gautier et Lagrost, 2011 (160)

### 3. Clairance hépatobiliaire des LPS

#### a. Le foie, site majeur de prise en charge des LPS

Les transports inverses du cholestérol et des LPS s'achèvent au niveau hépatique. Chez le lapin, l'injection de LPS radio-marqués montre qu'ils sont rapidement transportés vers le foie quand ils sont complexés à des lipoprotéines **(175)**. Cette liaison diminue la durée pendant laquelle il est possible de détecter une activité endotoxinique dans le plasma et favorise l'élimination des LPS dans la bile **(176,177)**.

Les principales cellules impliquées dans l'assimilation du LPS sont les hépatocytes et les macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer (KC). Le mécanisme de prise en charge par les hépatocytes est dépendant de TLR4 alors qu'il est permis par SR-BI dans les KC **(178,179)**. Il est par ailleurs suggéré que c'est principalement le défaut de clairance des LPS par les hépatocytes qui aboutit à une forte réaction inflammatoire. Ainsi, il semblerait que les petites quantités de LPS circulants soient prises en charge par les KC et que les hépatocytes interviennent lorsque leur concentration est plus importante.

Les travaux de Yao et son équipe précisent que l'élimination rapide des LPS transportés par les HDL ferait intervenir les cellules sinusoidales endothéliales du foie par un mécanisme dépendant de SR-BI. De plus, ils confirment que les KC interviendraient plus tardivement et dans une moindre mesure **(180)**.

#### b. Détoxification et élimination biliaire

La liaison des LPS aux lipoprotéines est un mécanisme réversible **(181)**. Pour neutraliser définitivement l'activité endotoxinique, ils doivent être détoxifiés et éliminés dans la bile. La prise en charge par le foie constitue ainsi une réelle voie de clairance.

Dans un premier temps, la structure du lipide A est modifiée par l'action d'enzymes, ce qui réduit irrémédiablement son immunogénicité. Dans les KC, les lipides A sont déacylés par l'AOAH **(182)** alors que l'argininosuccinate synthase semble impliquée dans la détoxification par les hépatocytes **(183)**. Les LPS modifiés sont ensuite excrétés dans la bile qui est l'accepteur final du RLT. Le processus par lequel les cellules du foie transportent le LPS n'est que partiellement élucidé. Au sein des

hépatocytes, il a été proposé qu'un mécanisme vésiculaire dépendant des microtubules permettrait d'acheminer les LPS jusqu'aux canalicules biliaires **(184)**. Les acides biliaires concourent également à l'inactivation des LPS par leur action détergente **(185)**.

## Objectifs

Le rôle péjoratif des LPS circulants dans la physiopathologie de la GVHa a été bien décrit. La plupart des travaux participant à ce constat sont basés sur des tests LAL pour quantifier l'activité endotoxinique dans les échantillons biologiques. Toutefois, cette technique n'offre qu'une représentation partielle des LPS circulants. C'est pourquoi nous proposons de réévaluer leur rôle dans la GVHa à l'aide de techniques innovantes permettant de rendre compte de leur diversité de structure et de leur neutralisation par les lipoprotéines.

De plus, si les mécanismes de perte d'intégrité de la barrière intestinale et de translocation bactérienne provoquant l'élévation des LPS plasmatiques au cours de la GVHa ont été étudiés, aucune donnée n'a été rapportée sur leur devenir dans l'organisme et sur leur prise en charge par les lipoprotéines. Un des objectifs de ces travaux est donc d'explorer le métabolisme des LPS, notamment leur transport inverse, dans le contexte de la GVHa.

Enfin, cibler la cascade inflammatoire initiée par les LPS apparaît comme une approche potentielle de prévention et de traitement de la GVHa. La modulation de différents effecteurs du transport inverse des LPS a montré des résultats encourageants dans le traitement des chocs septiques. Par exemple, l'augmentation du taux de HDL circulantes **(186)** ou l'administration de PLTP recombinante **(169)** permettent de limiter les complications et/ou d'améliorer la survie dans des modèles de sepsis et de choc septique chez le rongeur. Nous proposons d'évaluer l'intérêt thérapeutique de la modulation du transport inverse des LPS sur la sévérité de la GVHa.

# **Matériel & Méthodes**

# Matériel et Méthodes

## I. Modèles expérimentaux de GVHa

### Souris

Les souris C57Bl/6J (H-2<sup>b</sup>), BALB/cByJ (H-2<sup>d</sup>) et C3H/HeN (H-2<sup>k</sup>) ont été acquises auprès de Charles River ou Janvier Labs. Les souris C57Bl/6J PLTP *knock-out* (PLTP<sup>-/-</sup>) nous ont été gracieusement fournies par l'équipe du docteur Laurent Lagrost (UMR1231, Dijon, France). Les souris C57Bl/6J *APOA1 knock-out* (*Apoa1*<sup>tm1Unc</sup>) ont été acquises auprès de Jackson Laboratories et avaient un fond génétique C57Bl/6 homogène depuis au moins 10 générations. Nous avons ensuite maintenu un élevage au sein de notre animalerie.

Toutes les souris ont été hébergées dans des cages filtrées avec un accès libre à la nourriture et à l'eau supplémentée en néomycine (1,1 g/L, Sigma-Aldrich) dans l'animalerie de l'UMR1098 sous des conditions « dépourvues de pathogènes spécifiques ». Quand les conditions expérimentales le permettaient, les souris d'une même cage ont été aléatoirement réparties dans les différents groupes de greffe et/ou de traitement. Toutes les expériences ont été approuvées par le comité d'éthique local « Comité d'éthique bisontin en expérimentation animale » (projet #08010R).

### Procédure de greffe de cellules hématopoïétiques

Tous les animaux utilisés étaient des mâles âgés de 7 à 12 semaines au début des expérimentations. A J-1, les souris receveuses ont reçu une dose létale unique d'ICT de 8,5 Gy (BALB/c) ou 10 Gy (C57Bl/6) à l'aide d'un cabinet MultiRad 160 (Faxitron). Pour induire la survenue d'une GVHa chez les souris receveuses BALB/c, elles ont reçu à J0, par voie intraveineuse, une suspension cellulaire contenant  $5 \cdot 10^6$  cellules de moelle osseuse déplétée en LT et  $1 \cdot 10^6$  LT spléniques provenant de souris donneuses C57Bl/6 (groupe allogénique « allo ») ou BALB/c (groupe syngénique « syng »). Les fractions ont été déplétées ou enrichies en LT CD3<sup>+</sup> grâce à des tris immuno-magnétiques avec les kits *CD3 MicroBead Kit* et *Pan T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec), respectivement et selon les instructions du fournisseur. La pureté moyenne des tris était de  $90,5 \pm 6,7\%$ .

Pour induire la survenue d'une GVHa chez les souris receveuses C57Bl/6, elles ont reçu à J0, par voie intraveineuse, une suspension cellulaire contenant  $20 \cdot 10^6$  cellules de moelle osseuse et  $2-5 \cdot 10^6$  LT spléniques provenant de souris donneuses C3H/HeN (allo) ou C57Bl/6 (syng). La fraction splénique a été enrichie en LT CD3<sup>+</sup> par un tri immuno-magnétique avec le kit *EasySep T Cell Isolation Kit* (Stemcell), selon les instructions du fournisseur. La pureté moyenne était de  $91,6 \pm 3\%$ .

### Évaluation de la GVHa

La survie après la greffe a été suivie quotidiennement et l'apparition d'une GVHa systémique a été évaluée trois fois par semaine à l'aide d'un score décrit par l'équipe de Ferrara **(62)**. Ce score associe 5 critères (évalués de 0 à 2 pour un total maximal de 10) : la perte de poids, la courbure de l'animal, son activité, l'apparence de sa fourrure et la présence de lésions cutanées. Les animaux présentant une GVHa sévère (score > 6/10) ont été euthanasiés dans le respect des recommandations éthiques.

L'intégrité de la barrière intestinale a été évaluée grâce à un test *in vivo* au FITC-Dextran 4 kDa administré *per os* (16 mg par souris, Sigma-Aldrich). Quatre heures plus tard, le plasma des souris a été prélevé et la concentration en FITC-Dextran a été estimée à partir d'une gamme étalon sur un spectrophotomètre PerkinElmer (ex/em = 485/535 nm).

Les dommages de l'épithélium intestinal ont été appréciés par l'analyse histologique de coupes minces d'intestin grêle et de colon des souris receveuses colorées à l'hématoxyline/éosine. Le score histopathologique a été déterminé par deux personnes dont un anatomopathologiste (Pr. S. Valmary-Degano, CHU de Besançon) et prend en compte quatre critères : la présence de corps apoptotiques, la modification de l'architecture épithéliale, la présence d'abcès cryptiques et la présence d'un infiltrat inflammatoire. Un score de 0 à 3 a été attribué à chacun de ces critères en fonction de leur sévérité pour un total maximal de 12 **(187)**.

### **Prélèvement sanguin**

Après 4 heures de mise à jeun, des échantillons de sang ont été collectés aux temps indiqués par voie rétro-orbitale dans des tubes EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique). Le plasma a été séparé des cellules sanguines par centrifugation (20 min, 1300 x g, 4°C). Pour certaines expériences, les plasmas ont été séparés par ultracentrifugations successives en fraction associée aux HDL ( $1,063 < d < 1,21$ ) et en fraction libre (non associée aux lipoprotéines,  $d > 1,21$ ) (168).

## **II. Modalités de traitement des souris**

### **Administration d'acide ursodésoxycholique (UDCA)**

Les souris allogreffées ont reçu de l'UDCA (CHU de Besançon) par (i) voie intrapéritonéale (25 mg ou 50 mg/kg en NaCl 0,05% Tween-20) à J+4, J+6 et J+8 après la greffe ou (ii) par administration quotidienne *per os* entre J0 et J+9 (50 ou 100 mg/kg en NaCl 2% Glycérol) ou (iii) par 3 administrations hebdomadaires *per os* entre J-1 et J+24 (750 mg/kg en NaCl 2% Glycérol).

### **Isolement et administration des iHDL (HDL isolées)**

Le plasma utilisé pour l'isolement des iHDL provenait de donneurs sains de l'Établissement Français du Sang de Bourgogne Franche-Comté après signature d'un consentement éclairé (autorisation AC-2015-2408). Les iHDL ont été séparées par ultracentrifugations successives sur gradient de bromure de potassium ( $1,063 < d < 1,21$ ). La fraction isolée a été dialysée contre du PBS 1X pendant 24h, puis la concentration protéique a été mesurée à l'aide d'un kit de dosage BCA (Pierce) selon les recommandations du fournisseur.

Les iHDL ont été administrées 3 fois par semaine par voie intraveineuse aux souris receveuses entre J-1 et J+24 autour de la transplantation. Les souris ont reçu un total de 12 injections de 20 mg de protéines/kg (300 µL par injection, véhicule : NaCl).



### III. Dosages et expérimentations *ex vivo* et *in vitro*

#### Dosages immuno-enzymatiques des biomarqueurs de GVHa, de sCD14 et de cytokines circulantes

Des échantillons de plasmas des souris receveuses ont été prélevés 6 ou 15 jours après la transplantation. Les concentrations circulantes de REG3 $\gamma$  (Cloud-Clone), ST2, CD14 (R&D Systems), IL-6 et TNF- $\alpha$  (Biolegend) ont été mesurées par technique ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) à l'aide de kits commerciaux, selon les recommandations des fournisseurs.

#### Quantification des LPS

Tout le matériel utilisé était apyrogène ou décontaminé par autoclavage à 250°C et les réactifs utilisés étaient de grade « *endotoxin-free* ». La concentration des LPS totaux a été déterminée dans les échantillons de plasma et de bile par quantification directe des chaînes acyles caractéristiques du lipide A des LPS : l'hydroxylaurate (C12:0), l'hydroxymyristate (ou 3HM, C14:0), l'hydroxypalmitate (C16:0) et l'hydroxystéarate (C18:0). La technique Endoquant® développée par l'UMR1231 (Dijon, France (**123**)) repose sur l'hydrolyse des échantillons, l'extraction des acides gras libres par la méthode « *water/hexane* » et leur séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance (*Infinity 1200 HPLC binary system*, Agilent). La détection est assurée par spectrométrie de masse en tandem (*QQQ 6460 triple quadrupole mass spectrometer*, Agilent).

L'activité endotoxinique dans les échantillons de plasma dilués au 1:20<sup>e</sup> a été mesurée à l'aide d'un test chromogénique au *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) selon les instructions du fournisseur (QCL-1000, Lonza).

#### Test de neutralisation des LPS par le plasma

Des cellules HEK-Blue exprimant de façon stable TLR4, CD14, MD2 et un gène rapporteur sous la dépendance de NF- $\kappa$ B (InvivoGen) ont été cultivées en plaques 96 puits selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont été traitées avec 0,01 EU/mL de LPS standard pendant 21h en absence ou en présence de 2,5% de plasma provenant des souris receveuses. Le surnageant de culture a ensuite été mélangé au milieu de détection chromogénique. L'induction de NF- $\kappa$ B par la liaison du

LPS à TLR4/CD14/MD2 a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 635 nm (PerkinElmer). Les résultats sont présentés comme un index de neutralisation dont la référence est la densité optique obtenue avec du plasma de souris naïve.

### **Mesure de l'activité PLTP**

L'activité PLTP a été quantifiée à l'aide d'un kit commercial (Roar Biomedical) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, le plasma des souris receveuses (prélevé après une période de mise à jeun de 4h) a été incubé avec des liposomes donneurs contenant des phospholipides fluorescents et des liposomes accepteurs. Le transfert des phospholipides marqués a été suivi à l'aide d'un spectrophotomètre *Victor multilabel counter* (ex/em = 465/535 nm, PerkinElmer).

### **Dosage des HDL circulantes**

Le HDL-cholestérol a été mesuré dans le plasma des souris receveuses (prélevé après une période de mise à jeun de 4h) à l'aide d'un automate Indiko et de kits commerciaux spécifiques (Thermo Scientific).

### **Extraction des cellules immunitaires de la rate et du foie**

Les splénocytes des souris ont été obtenus par dissociation manuelle des rates. Les cellules de l'infiltrat immunitaire hépatique ont été obtenues par dissociation manuelle des foies suivie d'un isolement sur gradient de Percoll selon une méthode décrite par Blom et al. (188). Les suspensions cellulaires obtenues étaient constituées à  $98,4 \pm 0,85\%$  de leucocytes CD45<sup>+</sup>. Les globules rouges ont été éliminés par incubation avec une solution de lyse osmotique (NH<sub>4</sub>Cl 41.45 g/L, EDTA 0.185 g/L, KHCO<sub>3</sub> 5 g/L, H<sub>2</sub>O).

### **Analyse de la polarisation des LT et de la maturation/activation des CPA par cytométrie en flux**

Pour l'analyse de la polarisation des LT, un million de cellules a été stimulé pendant 4h avec 50 g/mL de phorbol-myristate-acétate, 1 µg/mL de ionomycine (Sigma-Aldrich) et 1 µL/mL de bréfeldine A (*Golgi Plug*, BD Bioscience) avant le marquage. Pour l'analyse de la maturation des DC, un million de cellules fraîches a été utilisé. Pour l'analyse de l'activation des CPA (sécrétion de cytokines), un million de cellules a été stimulé pendant 4h avec 1 µg/mL de LPS (*E. coli* serotype O55:B5, Sigma-Aldrich) et 1µg/mL de bréfeldine A (*Golgi Plug*, BD Bioscience) avant le marquage.

Les cellules ont été marquées avec un marqueur de viabilité *Zombie Aqua dye* (Biolegend), selon les instructions du fournisseur, puis avec les anticorps de marquage membranaire décrits dans la **Table H**. Pour l'analyse de la sécrétion de cytokines, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit *FoxP3/transcription factor buffer set* (Invitrogen) avant le marquage intracellulaire avec les anticorps décrits dans la **Table I**. Les différents marquages ont été analysés par cytométrie en flux (BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences) et les données ont été compilées à l'aide du logiciel FlowJo 10 (FlowJo, LLC).

**Table H – Références des anticorps utilisés pour les marquages membranaires :**

Cible – Fluorophore	Référence	Cible – Fluorophore	Référence
CD3 – PerCP	BD Biosciences #553067	CD19 – V450	BD Biosciences #560375
CD3 – APC-Vio770	Miltenyi #130-109-840	CD25 – PE-Vio770	Miltenyi #130-108-998
CD4 – V450	BD Biosciences #560468	CD80 – BV605	BD Biosciences #563052
CD8 – PerCP	BD Biosciences #553036	CD86 – BV711	BD Biosciences #740688
CD11b – FITC	BD Biosciences #553310	F4/80 – BV421	BD Biosciences #565411
CD11c – APC	BD Biosciences #550261	IA/IE – PE-Cy7	Biolegend #107630
CD11c – BV711	BD Biosciences 563048		

**Table I – Références des anticorps utilisés pour les marquages intracellulaires :**

Cible – Fluorophore	Référence	Cible – Fluorophore	Référence
FoxP3 – PE	Biolegend #126404	IL-12 – APC	BD Biosciences #554480
IFN- $\gamma$ – FITC	Miltenyi #130-109-721	TNF- $\alpha$ – PerCP-Cy5.5	BD Biosciences #560659
IL-6 – PE	Biolegend #504503		

### **Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)**

Afin d'apprécier la capacité des CPA spléniques des souris receveuses à promouvoir des réactions allogéniques, une MLR a été réalisée 6 jours après la greffe. Brièvement, des LT provenant de souris C57Bl/6 naïves ont été marqués au CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) et mis en culture avec des splénocytes issus de souris allogreffées traités à la mitomycine C (rapport : 1 LT pour 3 splénocytes). A l'issue de 5 jours de co-culture, la dilution du marquage CFSE a été analysée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec un marqueur de viabilité *Zombie Aqua dye* (Biolegend) et un anticorps anti-CD3 couplé à l'APC (BD Biosciences #553066) (acquisition : BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences, analyse : logiciel FlowJo 10, FlowJo, LLC).

### **Cultures bactériennes et extraction des LPS par méthode « *hot phenol-water* »**

Les souches bactériennes *Escherichia coli* (CIP7624), *Bacteroides dorei* (JCM13471) et *Bacteroides caccae* (ATCC43185) ont été acquises auprès de l'*American Type Culture Collection*. Les LPS ont été extraits des culots bactériens selon la technique « *hot phenol-water* » décrite par Davis et Goldberg (189). Les produits d'extraction ont ensuite été analysés par Endoquant® comme décrit ci-dessus.

## **IV. Représentation et analyse statistique des résultats**

Les résultats ont été représentés par la moyenne plus ou moins l'erreur à la moyenne (SEM) des données. Les valeurs aberrantes ont été éliminées par la méthode ROUT ( $\alpha = 0,1\%$ ) et la distribution des données a été examinée grâce au test de normalité de D'Agostino et Pearson. Les groupes ont ensuite été comparés à l'aide de tests paramétriques (ANOVA et post-test de Bonferroni ou test t non apparié) ou de leurs équivalents non paramétriques (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn ou test de Mann-Whitney) si les données ne suivaient pas une distribution gaussienne. Les corrélations ont été évaluées à l'aide du test non paramétrique de Spearman. Les courbes de survie ont été comparées en utilisant un test de Mantel-cox (*log-rank*). Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative pour chacune des expériences. Les données ont été représentées et analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

# Résultats

# Résultats

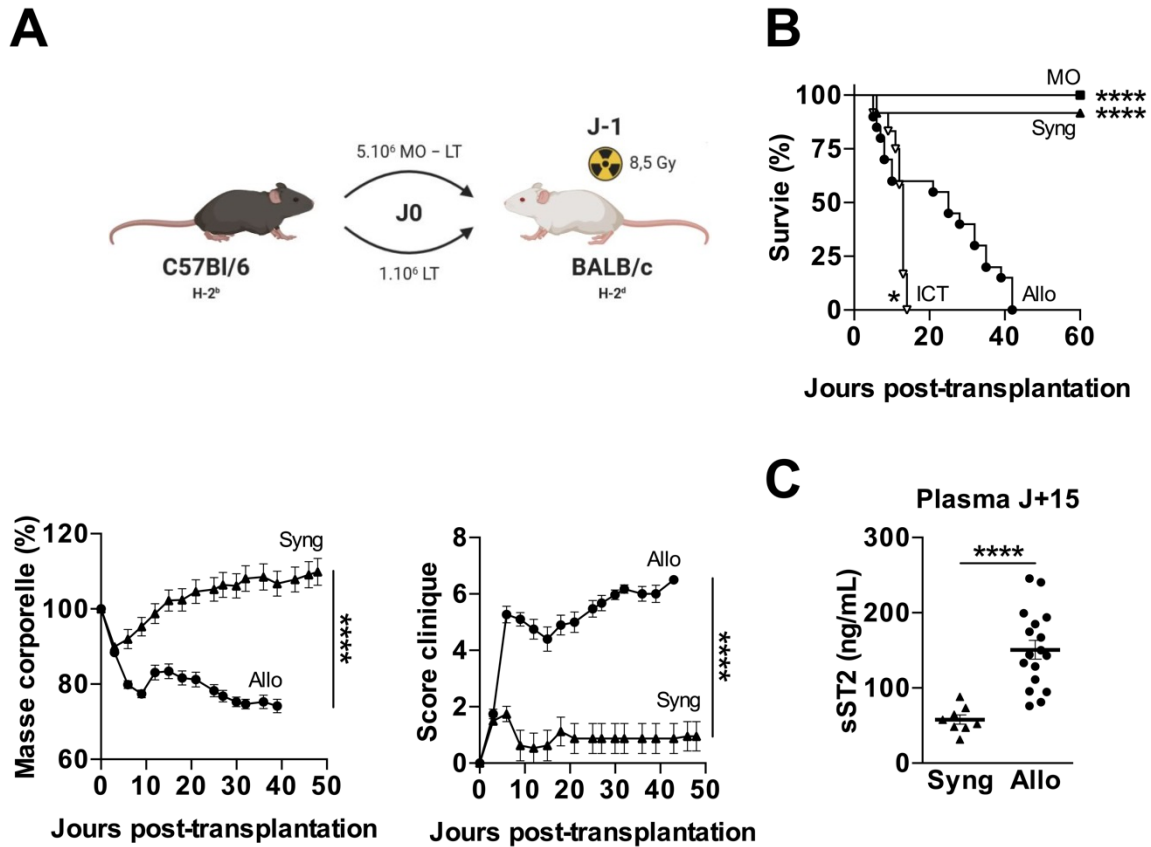
Les résultats présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet du dépôt d'une demande de brevet sous le numéro FR1910075 (**Annexe 1**) et seront synthétisés dans une publication scientifique (en cours de préparation).

## I. Étude du métabolisme des LPS dans un modèle murin de GVHa

Le rôle des LPS comme signaux de danger initiateurs de la GVHa et l'identification des bactéries intestinales comme leur source principale ont été décrits dès les années 1990 (**92,110,138**). Toutefois, l'ensemble de ces travaux fondateurs repose sur une quantification de l'activité biologique des LPS, *via* des tests au LAL, et n'informe pas sur le devenir des LPS circulants. Ici, nous avons utilisé des modèles expérimentaux afin d'explorer le métabolisme des LPS dans le contexte de la GVHa à l'aide d'une technique innovante de détection des LPS par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (technologie Endoquant® (**123**)).

Nous devons disposer d'un modèle expérimental de GVHa robuste. Dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c, des souris receveuses BALB/c (H-2<sup>d</sup>) ont reçu une dose létale d'ICT (8,5 Gy) puis une suspension cellulaire par voie intraveineuse de  $5 \cdot 10^6$  cellules de moelle osseuse déplétée en LT et  $1 \cdot 10^6$  LT spléniques provenant de souris donneuses C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>, groupe allogénique « allo ») ou BALB/c (contrôle syngénique « syng ») (**Figure 1A**). L'apparition et le développement de la pathologie ont été suivis tout au long des expérimentations en évaluant la survie (quotidiennement) et le score clinique (3 fois par semaine). La médiane de survie des souris allogreffées est de 25 jours après la greffe et toutes les souris décèdent au plus tard après 42 jours (**Figure 1B**). Les souris des groupes contrôles (syngénique ou moelle osseuse seule « MO ») présentent quant à elles une survie de 91,7% et 100% respectivement. La dose d'ICT employée est létale pour l'ensemble des souris non

greffées (« ICT ») avec une médiane de survie de 13 jours. La masse corporelle et le score clinique spécifique ont également été mesurés afin d'évaluer le développement de la GVHa (**Figure 1B**). Une perte de poids et les premiers signes appréciables (courbure dorsale, négligence du toilettage, inflammation de la muqueuse oculaire) apparaissent dès les premiers jours suivant la greffe et persistent tout au long des expérimentations. Environ 40% des souris allogreffées ne survivent pas à ce premier pic inflammatoire (J+10) et les survivantes développent d'autres signes évaluables tels qu'une sécheresse cutanée allant jusqu'à l'alopecie. Par ailleurs, la concentration circulante de la forme soluble de ST2 (sST2) a été dosée dans le plasma des souris receveuses 15 jours après la transplantation (**Figure 1C**). Ce biomarqueur spécifique de la GVHa (**64**) est significativement plus élevé pour les souris ayant reçu des LT allogéniques ( $150,8 \pm 12,5$  ng/mL) par rapport à celles ayant reçu des LT syngéniques ( $58 \pm 6,2$  ng/mL). Ainsi, le suivi du développement de la GVHa à l'aide d'un score clinique et d'un biomarqueur spécifiques assure la validité du modèle expérimental C57Bl/6 → BALB/c, précédemment décrit dans la littérature (**190**) pour la suite de ces travaux.

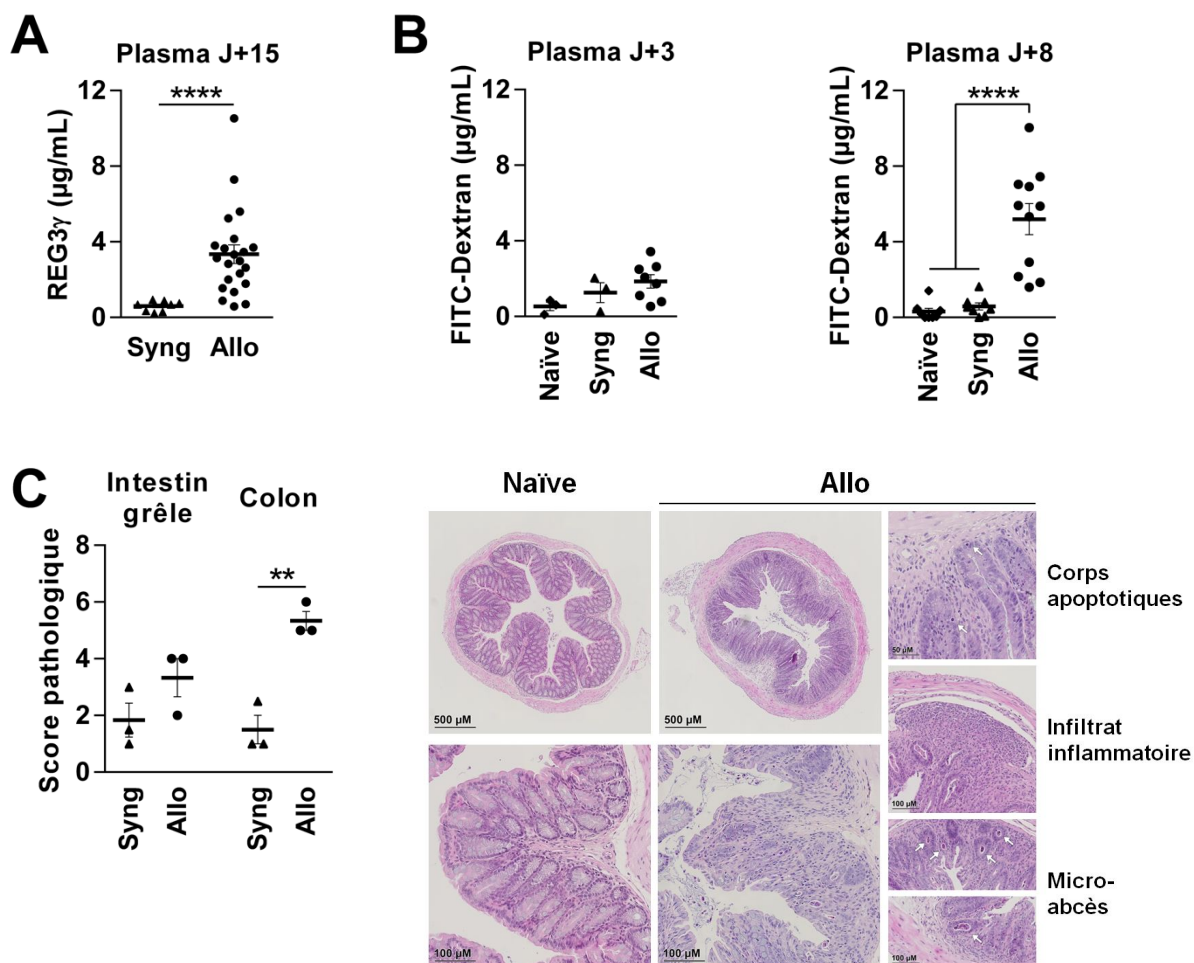


**Figure 1 – La greffe allogénique de cellules de moelle osseuse et de LT C57Bl/6 provoque une GVHa chez les souris receveuses BALB/c. (A)** Des souris BALB/c irradiées (8,5 Gy) ont été transplantées avec  $5.10^6$  cellules de moelle osseuse déplétée des cellules CD3<sup>+</sup> et  $1.10^6$  LT provenant de souris BALB/c (Syng) ou C57Bl/6 (Allo) (modèle C57Bl/6 → BALB/c). **(B)** La survie, la masse corporelle et le score clinique ont été suivis pendant 60 jours après la greffe (n=12-20 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Mantel-Cox ou test t non apparié sur les aires sous la courbe). **(C)** La concentration de la forme soluble de la protéine ST2 (sST2) a été dosée par méthode immuno-enzymatique dans le plasma des souris 15 jours après la transplantation (n=8-17 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test t non apparié).



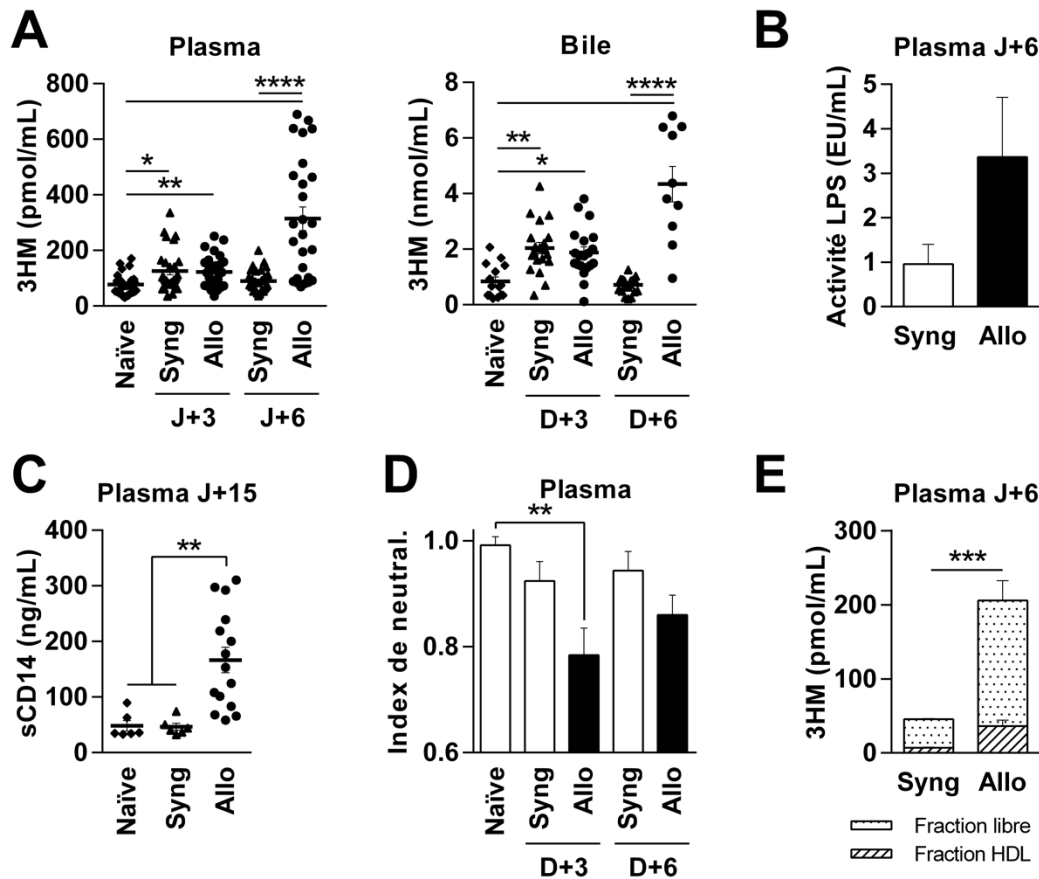
La voie d'entrée supposée principale des LPS dans l'organisme après une alloCH est la translocation intestinale. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'intégrité de l'épithélium digestif dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c. Tout d'abord, un biomarqueur plasmatique spécifique de la GVHa intestinale (**63**), REG3 $\gamma$  (équivalent de REG3 $\alpha$  chez l'homme), a été dosé 15 jours après la transplantation (**Figure 2A**). Si REG3 $\gamma$  est quasiment absent du plasma des souris syngéniques ( $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ), une élévation significative est détectée pour les souris allogreffées ( $3,3 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ). Par ailleurs, la perméabilité de l'intestin grêle des souris receveuses a été évaluée *in vivo* à l'aide d'un test de translocation de billes de dextran (4 kDa) couplées à un fluorophore (FITC) administrées *per os* 3 et 8 jours après la greffe (**Figure 2B**). La fluorescence a ensuite été mesurée dans le plasma 4h après l'administration (**191**). Si la perméabilité de l'intestin des souris naïves est pratiquement nulle ( $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ), elle augmente légèrement à J+3 pour les souris ayant reçu une ICT ( $1,3 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$  pour le groupe syngénique,  $1,9 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$  pour le groupe allogénique). De façon plus remarquable, la perméabilité intestinale des souris syngéniques revient à une valeur proche des souris naïves ( $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ) dès J+8 tandis que la translocation des billes de dextran continue d'augmenter chez les souris allogéniques ( $5,2 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ ).

Ces données suggèrent que rapidement après la transplantation, les réactions allogéniques fragilisent l'épithélium intestinal et augmentent sa perméabilité à des composés normalement séquestrés dans la lumière intestinale. Enfin, l'altération de l'épithélium intestinal a été confirmée par l'analyse histopathologique de coupes minces d'intestin grêle et de colon colorées à l'hématoxyline/éosine (**Figure 2C**). L'appréciation à J+15 des modifications de l'architecture épithéliale et de la présence de corps apoptotiques, d'infiltrat inflammatoire et de micro-abcès cryptiques confirme l'atteinte intestinale dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c, particulièrement au niveau du colon. Ainsi, il apparaît que l'épithélium intestinal est rapidement lésé à cause du conditionnement par ICT (J+3) et que les lésions sont majorées dans les jours suivants par les réactions allogéniques (J+8 et J+15).



**Figure 2 – Le conditionnement pré-greffe et la réaction allogénique altèrent l’intégrité de l’épithélium intestinal.** Dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c, **(A)** la concentration de la protéine REG3γ a été dosée par méthode immuno-enzymatique dans le plasma des souris 15 jours après la transplantation. La présence de cet AMP dans la circulation générale des souris allogéniques reflète une altération de l’épithélium intestinal et plus particulièrement des cellules de Paneth (n=8-22 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Mann-Whitney). **(B)** La perméabilité intestinale a été évaluée *in vivo* par administration *per os* de 16 mg de FITC-Dextran (4 kDa) suivie d’une mesure de la fluorescence à 535 nm dans le plasma des souris receveuses, 3 et 8 jours après la transplantation (n=3-11 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$  1-way ANOVA et post-test de Bonferroni). **(C)** Quinze jours après la greffe, les dommages de l’épithélium digestif ont été appréciés par l’analyse histologique de coupes minces d’intestin grêle et de colon des souris receveuses colorées à l’hématoxyline/éosine. Le score histopathologique a été déterminé par deux personnes dont un anatomopathologiste et prend en compte la modification de l’architecture épithéliale, la présence de corps apoptotiques, d’infiltrat inflammatoire et de micro-abcès cryptiques (n=3 souris/groupe, 1 expérience, \*\*  $p < 0,01$ , 2-way ANOVA).

Il semble ainsi que l'épithélium intestinal soit très vite perméabilisé après l'alloCH, c'est pourquoi nous avons estimé la translocation de LPS à travers celui-ci précocement après la greffe dans le plasma et dans la bile des souris receveuses (J+3 et J+6) (**Figure 3A**). La technique Endoquant® (**123**) repose sur la quantification absolue des chaînes acyles des LPS par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Le 3-hydroxymyristate (3HM) correspond aux chaînes de 14 carbones, largement représentées dans les LPS de différentes souches d'entérobactéries (notamment *E. coli*). De plus, cet acide gras hydroxylé est spécifique des bactéries et n'est retrouvé qu'à l'état de traces chez les vertébrés. Ainsi, il constitue un marqueur de choix pour estimer la quantité de LPS total dans des échantillons biologiques. Le dosage Endoquant® du 3HM dans le plasma des souris ayant reçu un conditionnement par ICT montre une légère augmentation des LPS circulants dès J+3 ( $126,4 \pm 13,9$  pmol/mL pour le groupe syngénique et  $129 \pm 11,4$  pmol/mL pour le groupe allogénique) par rapport à des souris naïves ( $77,5 \pm 6,6$  pmol/mL). Rapidement (J+6), les taux de 3HM tendent à se normaliser dans le plasma des souris syngéniques ( $89,5 \pm 7,5$  pmol/mL) tandis que les réactions allogéniques semblent participer à une très forte élévation des LPS circulants chez les souris allogreffées ( $314,3 \pm 42,3$  pmol/mL). La même cinétique est observée dans la bile des souris receveuses, qui constitue l'accepteur final du métabolisme du LPS. Six jours après la transplantation, les taux de 3HM biliaires sont ainsi multipliés par 5 pour les souris ayant reçu des LT allogéniques par rapport aux souris naïves ( $4,3 \pm 0,6$  et  $0,8 \pm 0,2$  nmol/mL, respectivement). Afin de valider le dosage des LPS par Endoquant®, nous avons dosé l'activité endotoxinique par la technique historique utilisant le LAL (**Figure 3B**). Bien que préliminaires, les résultats corroborent l'élévation précoce des LPS actifs dans le plasma des souris allogéniques ( $3,4 \pm 1,3$  EU/mL) par rapport aux souris syngéniques ( $1 \pm 0,4$  EU/mL). Le dosage de la forme soluble de CD14 (sCD14), qui participe à la délivrance des LPS à son récepteur spécifique TLR4, permet d'estimer l'exposition aux LPS (**Figure 3C**). En effet, une corrélation entre le taux de sCD14 plasmatique et la réponse aux LPS circulants a été établie expérimentalement chez l'homme (**192**). Dans le plasma des souris allogreffées, la concentration de sCD14 est triplée par rapport à celle de souris naïves ou syngéniques, suggérant que les effets inflammatoires des LPS circulants persistent au moins 15 jours après la transplantation.

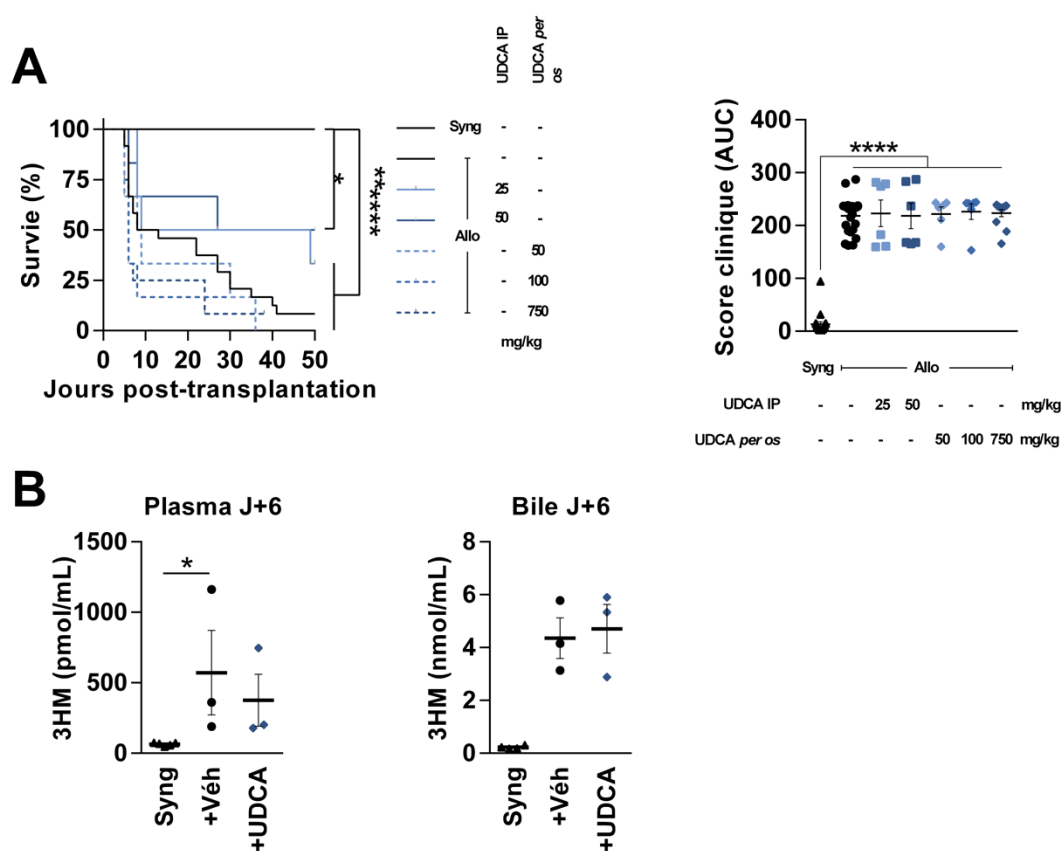


**Figure 3 – La GVHa augmente l’activité du LPS circulant. (A)** Le 3-hydroxymyristate (3HM) est un acide gras hydroxylé à 14 carbones (C14:0) dérivé du LPS. Il a été dosé dans le plasma et dans la bile des souris receveuses (modèle C57Bl/6 → BALB/c) par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS, Endoquant®) 3 et 6 jours après la transplantation (n=10-33 souris/groupe, 5 [plasma] ou 3 [bile] expériences indépendantes, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn ou 1-way ANOVA et post-test de Bonferroni). **(B)** L’activité du LPS dans le plasma des souris a été estimée à l’aide d’un dosage LAL 6 jours après la greffe (EU : unité d’endotoxines, unité arbitraire) (n=9 souris/groupe, 3 expériences indépendantes). **(C)** La concentration circulante de la forme soluble du corécepteur de TLR4, CD14 (sCD14) a été dosée par méthode immuno-enzymatique dans le plasma des souris 15 jours après la transplantation (n=6-15 souris/groupe, \*\*  $p < 0,01$ , test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn). **(D)** La capacité de neutralisation de l’activité endotoxinique du plasma des souris receveuses a été mesurée *in vitro* 3 et 6 jours après la greffe. Brièvement, des cellules reportrices HEK-Blue TLR4/CD14/MD2 ont été cultivées en présence de 2,5% de plasma et de 0,01 EU/mL de LPS standard. Le masquage de l’activité du LPS a été indexé sur des plasmas issus de souris naïves contrôles (n=11-16 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ , 1-way ANOVA et post-test de Bonferroni). **(E)** Le plasma de souris receveuses a été soumis à des ultracentrifugations séquentielles afin de séparer une fraction libre (non liée aux lipoprotéines) et une fraction liée aux HDL. Le 3HM a été dosé dans les différentes fractions à l’aide de la technique Endoquant® (n=3-4 souris/groupe, \*\*\*  $p < 0,001$ , 2-way ANOVA).

Une hypothèse pour expliquer l'accumulation de LPS immunologiquement actifs dans le plasma des souris allogreffées est la moindre efficacité d'élimination des LPS par des composants plasmatiques. Pour étudier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests *in vitro* de neutralisation de l'activité endotoxinique. Brièvement, des cellules HEK reportrices de l'activation de TLR4 ont été traitées avec une concentration connue de LPS activateur en présence de plasma de souris receveuses (**Figure 3D**). En rapportant l'intensité d'activation de TLR4 à l'intensité mesurée en présence de plasma de souris naïves ( $0,99 \pm 0,02$ ), ce test permet d'évaluer la faculté des composants plasmatiques à masquer l'activité endotoxinique d'une dose de LPS connue. Ainsi, la capacité de neutralisation de l'activité des LPS par le plasma est significativement altérée par l'allogreffe, rapidement après la transplantation (J+3,  $0,78 \pm 0,05$ ). Si cette diminution tend à se corriger par la suite, le plasma des souris allogreffées reste moins apte à neutraliser l'activité endotoxinique à J+6 ( $0,86 \pm 0,04$ ). L'incorporation des LPS dans les lipoprotéines circulantes limite l'interaction des LPS avec TLR4 et constitue donc une voie potentielle de neutralisation par les composants plasmatiques. Le dosage du 3HM dans différentes fractions de plasma séparées par ultracentrifugations séquentielles révèle que la majeure partie de l'élévation des LPS circulants est imputable aux LPS libres (non associés aux lipoprotéines) chez les souris allogreffées ( $169,5 \pm 26,8$  pmol/mL de LPS libres contre  $38,5 \pm 0,7$  pmol/mL pour le groupe syngénique) (**Figure 3E**). L'ensemble de ces données laisse penser que les LPS actifs s'accumulent dans le plasma des souris allogéniques car ils sont moins efficacement neutralisés par les lipoprotéines circulantes. Un des mécanismes principaux permettant le chargement des LPS dans les lipoprotéines, notamment les HDL, est la voie dite « du transport inverse » (RLT pour *Reverse LPS transport*) : les LPS sont pris en charge par les lipoprotéines grâce à l'action d'enzymes telles que la PLTP. Les LPS intégrés aux lipoprotéines sont ensuite acheminés vers le foie et éliminés dans la bile.

## II. Modulation des effecteurs du transport inverse des LPS

Afin d'explorer les effets réciproques de la GVHa et du transport inverse des LPS sur la physiopathologie de la maladie, nous avons modulé l'activité de différents composants présumés du RLT dans nos modèles expérimentaux : le flux biliaire, l'activité enzymatique PLTP et la présence de HDL circulantes.

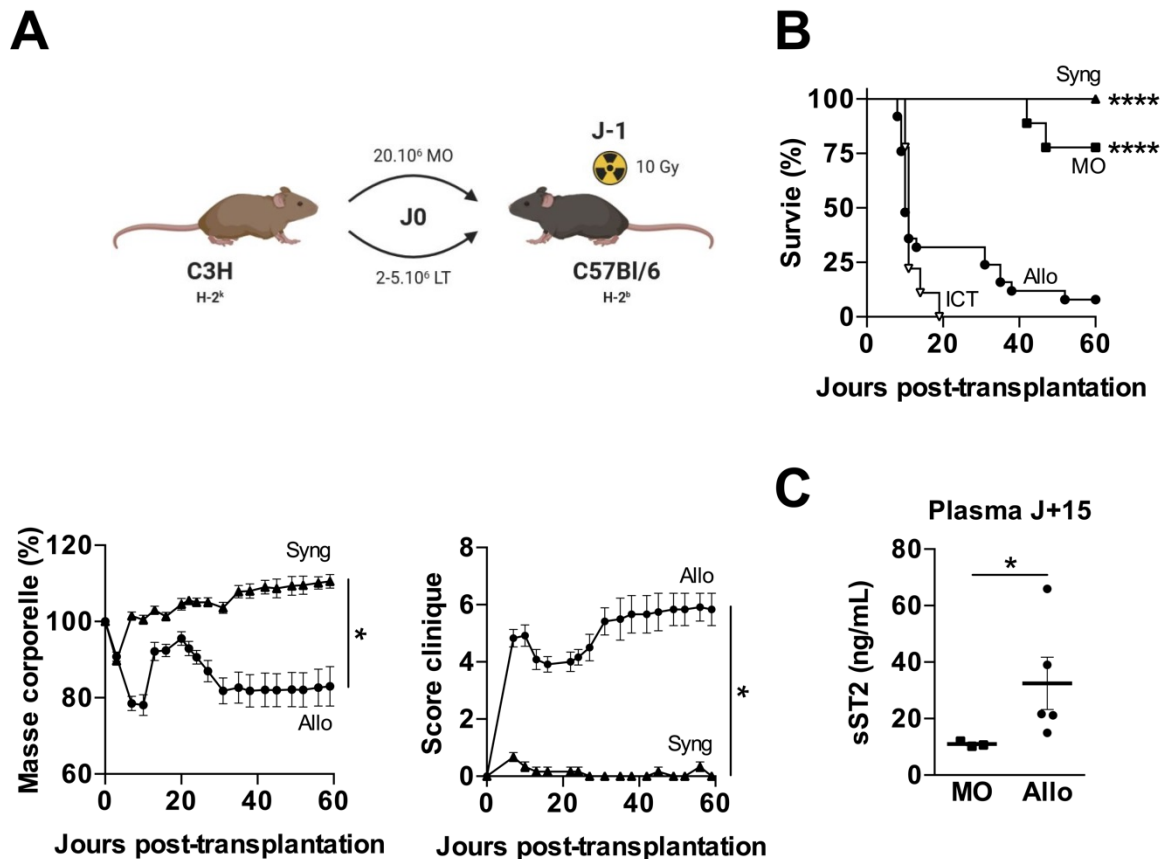


**Figure 4 – L'administration d'UDCA ne diminue pas la sévérité de la GVHa. (A)** Les souris receveuses (modèle C57Bl/6 → BALB/c) ont reçu de l'UDCA (i) par voie intrapéritonéale (IP) à J+4, J+6 et J+8 après la greffe (25 ou 50 mg/kg, NaCl 0,05% Tween-20), (ii) par administration quotidienne *per os* de J0 à J+9 (50 ou 100 mg/kg, NaCl 0,05% Tween-20) ou (iii) par 3 administrations *per os*/semaine entre J-1 et J+24 (750 mg/kg, NaCl 2% Glycérol). Les différentes modalités de traitement ne semblent pas améliorer ni la survie ni la sévérité de la GVHa des souris allogreffées (n=6-24 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Mantel-Cox ou test t non apparié sur les aires sous la courbe [AUC]). **(B)** Le 3HM a été mesuré à l'aide de la technique Endoquant® dans le plasma et la bile des souris ayant reçu 3 administrations hebdomadaires d'UDCA (750 mg/kg) ou de véhicule (NaCl 2% Glycérol) (n=3-5 souris/groupe, \*  $p < 0,05$ , test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn).

Des études récentes ont montré qu'une sécrétion biliaire fonctionnelle était nécessaire pour assurer un transport inverse efficace (193), c'est pourquoi nous avons administré de l'acide ursodésoxycholique (UDCA) aux souris receveuses. L'UDCA est un acide biliaire secondaire naturellement transformé par les bactéries intestinales à partir d'acide chénodésoxycholique. Il est présent en faible quantité chez l'homme, mais peut être supplémenté afin de dissoudre les calculs de cholestérol biliaires et d'augmenter le flux biliaire (effet cholérétique en diminuant l'hydrophobicité des acides biliaires), notamment dans le traitement des cholangites biliaires primitives et des cholangites sclérosantes primitives. Dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c, les souris allogreffées ont reçu plusieurs doses d'UDCA par voie orale ou intrapéritonéale. Si l'injection d'UDCA par voie intrapéritonéale semble limiter partiellement la mortalité, aucune modalité de traitement n'a permis d'améliorer significativement la survie ou la sévérité de la GVHa (Figure 4A). De plus, des résultats préliminaires suggèrent que l'administration d'UDCA *per os* ne diminue pas les concentrations plasmatiques et biliaires de LPS mesurées par Endoquant® (Figure 4B). Ainsi, il semble que la sécrétion biliaire ne soit pas la composante limitante pour la neutralisation des LPS circulants par le RLT dans le contexte de la GVHa.

Afin de déterminer si l'activité PLTP ou la disponibilité en HDL circulantes pouvaient influencer le transport des LPS et la sévérité de la GVHa, il nous fallait disposer d'un modèle expérimental où les souris receveuses étaient de fond génétique C57Bl/6. En nous appuyant sur les travaux de l'équipe de Blazar (194), des souris C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) ont reçu une dose létale d'ICT (10 Gy), puis une suspension cellulaire par voie intraveineuse de  $20 \cdot 10^6$  cellules de moelle osseuse et  $2-5 \cdot 10^6$  LT spléniques provenant de souris donneuses C3H (H-2<sup>k</sup>, groupe allogénique « allo ») ou C57Bl/6 (contrôle syngénique « syng ») (Figure 5A). La survie et le score clinique ont été évalués tout au long des expérimentations. La médiane de survie des souris allogreffées est de 10 jours après la greffe et seules 2 souris sur 25 sont encore vivantes 60 jours après la transplantation (Figure 5B). Les souris des groupes contrôles (syngénique ou MO) présentent quant à elles une survie de 100% et 79% respectivement. La dose d'ICT employée est létale pour l'ensemble des souris non greffées (« ICT ») avec une médiane de survie de 11 jours. Une perte de poids et une augmentation du score clinique de GVHa apparaissent rapidement après la greffe et persistent tout au long des expérimentations (Figure 5B). Dans le modèle C3H → C57Bl/6, le développement

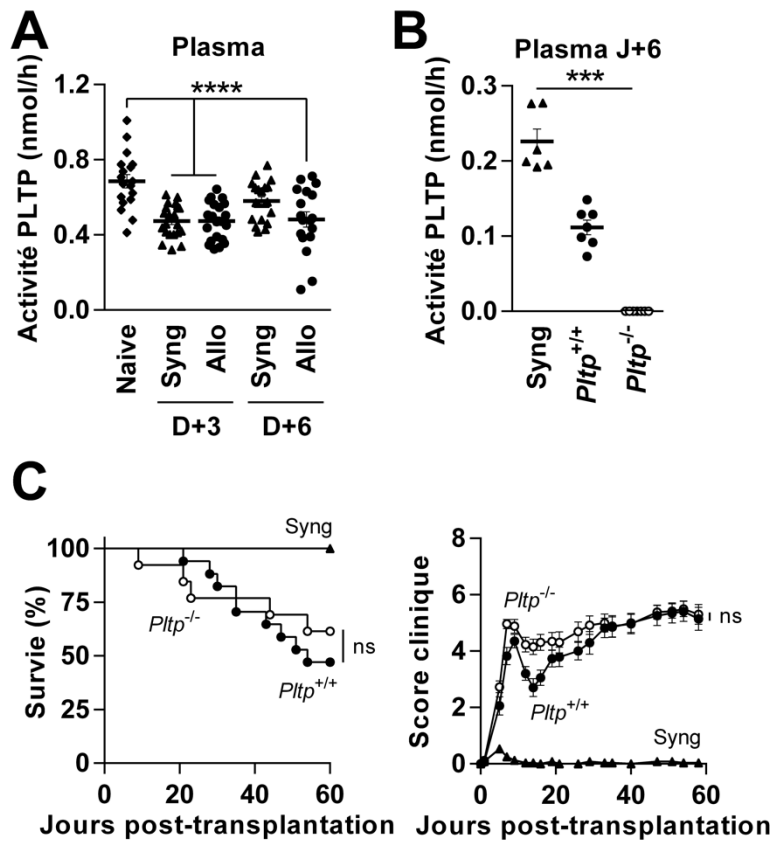
de la GVHa a également été confirmé par l'élévation de la concentration de sST2 dans le plasma des souris ayant reçu des LT allogéniques ( $32,5 \pm 9,3$  ng/mL) par rapport à celles ayant reçu des LT syngéniques ( $11 \pm 0,5$  ng/mL) (**Figure 5C**). Ainsi, la greffe de LT allogéniques C3H → C57Bl/6 permet bien le développement de signes cliniques et l'augmentation de biomarqueurs spécifiques de la GVHa.



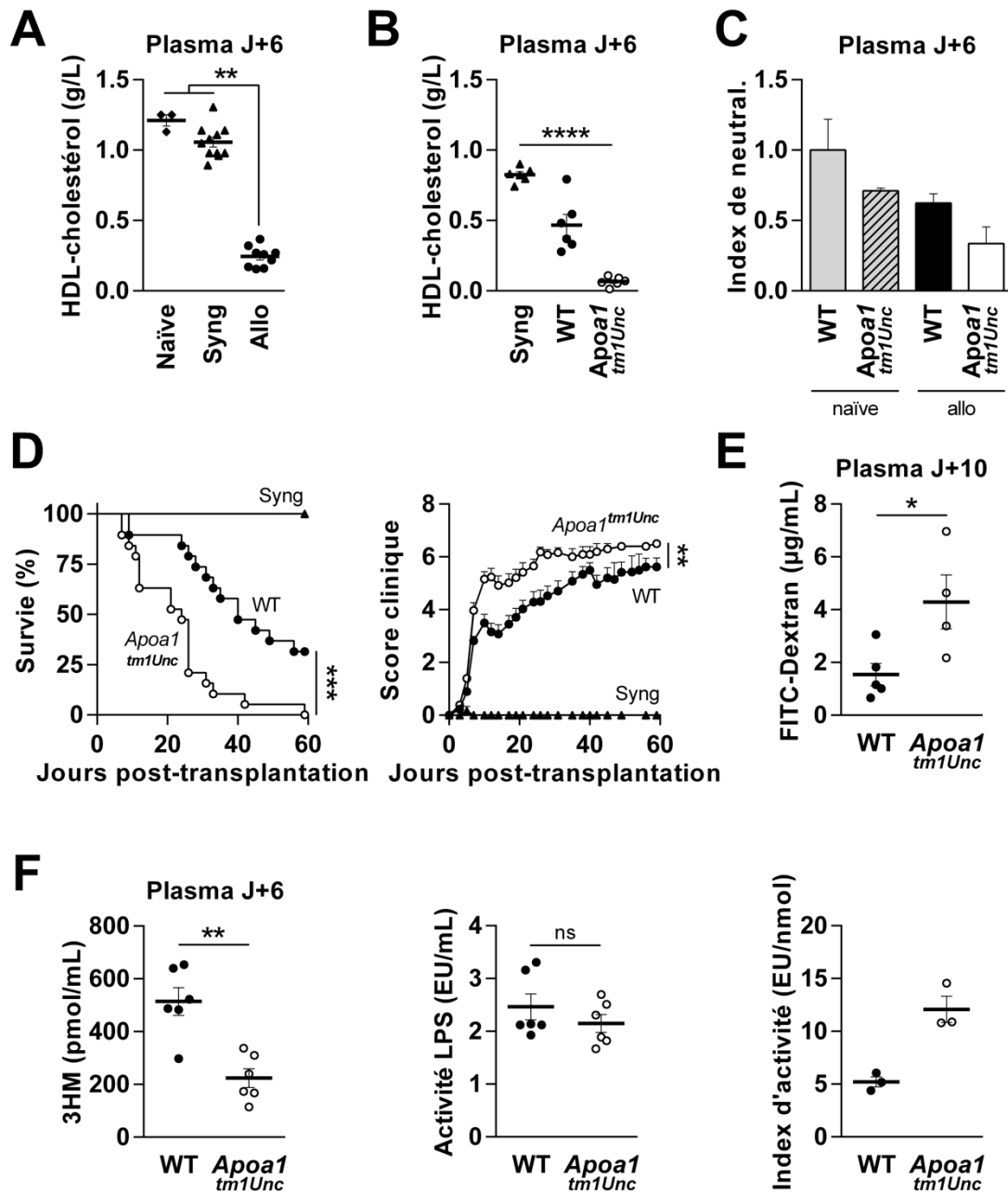
**Figure 5 – La greffe allogénique de cellules de moelle osseuse et de LT C3H provoque une GVHa chez les souris receveuses C57Bl/6. (A)** Des souris C57Bl/6 irradiées (10 Gy) ont été transplantées avec 20.10<sup>6</sup> cellules de moelle osseuse et 2-5.10<sup>6</sup> LT provenant de souris C57Bl/6 (Syng) ou C3H (Allo) (modèle C3H → C57Bl/6). **(B)** La survie (n=18-25 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*\*\*\* p < 0,0001, test de Mantel-Cox), la masse corporelle et le score clinique ont été suivis pendant 60 jours après la greffe (n=3-6 souris/groupe, \* p < 0,05, test t non apparié sur les aires sous la courbe). **(C)** La concentration de sST2 a été dosée par méthode immuno-enzymatique dans le plasma des souris 15 jours après la transplantation (n=3-5 souris/groupe, \* p < 0,05, test de Mann-Whitney).



La PLTP peut prendre en charge les LPS circulants et les intégrer dans les lipoprotéines circulantes, notamment les HDL. Son activité enzymatique a été dosée dans le plasma des souris receveuses (modèles C57Bl/6 → BALB/c) à l'aide d'un test de transfert de phospholipides fluorescents (**Figure 6A**). L'activité PLTP plasmatique est diminuée pour toutes les souris ayant reçu une ICT précocement après la greffe (J+3,  $0,47 \pm 0,02$  nmol/h pour les groupes syngénique et allogénique) et semble revenir à un taux physiologique ( $0,69 \pm 0,04$  nmol/h pour les souris naïves) plus rapidement pour les souris ayant reçu des LT syngéniques ( $0,58 \pm 0,02$  nmol/h) que pour les souris allogéniques ( $0,48 \pm 0,04$  nmol/h). Afin d'évaluer l'importance de l'activité PLTP dans le RLT et la sévérité de la GVHa, des souris receveuses C57Bl/6 *wild type* (WT, *Pltp*<sup>+/+</sup>) ou déficientes pour l'activité PLTP (*Pltp*<sup>-/-</sup>, **(195)**) ont reçu des LT allogéniques (C3H) (**Figure 6B**). La diminution de l'activité PLTP dans les souris WT allogreffées est également confirmée 6 jours après la transplantation dans le modèle C3H → C57Bl/6 ( $0,11 \pm 0,01$  nmol/h contre  $0,23 \pm 0,02$  nmol/h dans le plasma des souris syngéniques). Conformément aux résultats attendus avec la mutation du gène codant la PLTP, l'activité enzymatique est complètement abolie pour les souris receveuses *Pltp*<sup>-/-</sup> ( $0,0002 \pm 0,00004$  nmol/h). Toutefois, l'absence d'activité PLTP n'influence pas significativement la mortalité ou la sévérité de la GVHa dans notre modèle (**Figure 6C**). Ces résultats suggèrent que l'activité PLTP bien qu'impactée par la procédure d'allogreffe, et notamment par le conditionnement, ne semble pas être un facteur prépondérant dans la physiopathologie de la GVHa.



**Figure 6 – L’activité PLTP plasmatique ne semble pas avoir un impact relevant sur la sévérité de la GVHa.** (A) L’activité de transfert de composés lipidiques de la PLTP a été dosée dans le plasma des souris 3 et 6 jours après la transplantation (modèle C57Bl/6 → BALB/c) (n=18-21 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , 1-way ANOVA et post-test de Bonferonni). (B) Le même dosage d’activité a été reproduit dans le modèle C3H → C57Bl/6 avec des receveuses allogéniques exprimant (*Pltp*<sup>+/+</sup>) ou non (*Pltp*<sup>-/-</sup>) le gène de la PLTP (n=6-7 souris/groupe, \*\*\*  $p < 0,001$ , test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn). (C) La survie et le score clinique des souris receveuses allogéniques *Pltp*<sup>+/+</sup> et *Pltp*<sup>-/-</sup> ont été évalués quotidiennement (n=12-17 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, ns : non significatif, test de Mantel-Cox ou 1-way ANOVA et post-test de Bonferonni sur les aires sous la courbe).



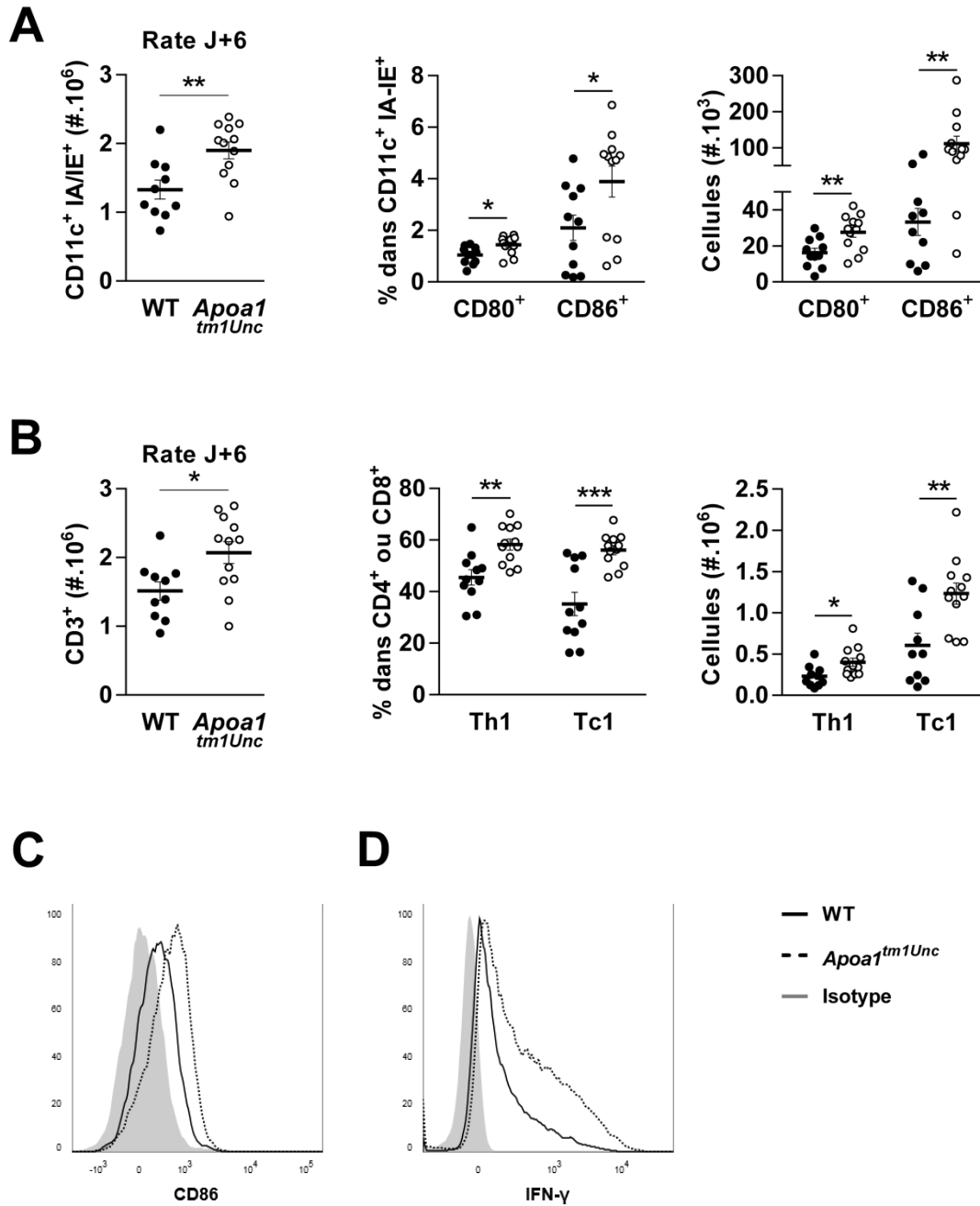
**Figure 7 – Le défaut de synthèse des lipoprotéines et l’absence de HDL circulantes aggravent la sévérité de la GVHa. (A)** Le taux de HDL circulantes a été estimé par le dosage du HDL-cholestérol dans le plasma des souris receveuses (modèle C57Bl/6 → BALB/c) 6 jours après la transplantation à l’aide d’un automate Thermo Fischer Indiko (n=3-11 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ , test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn). **(B)** L’effondrement des HDL circulantes dans le plasma des souris allogéniques a été confirmé dans le modèle C3H → C57Bl/6 par la même technique. Afin d’évaluer l’impact des HDL circulantes sur la sévérité de la GVHa, des souris exprimant (WT pour *wild type*) ou n’exprimant pas (*ApoA1<sup>tm1Unc</sup>*) la protéine APOA-1 ont reçu une greffe allogénique. Les souris *ApoA1<sup>tm1Unc</sup>* allogreffées présentent un taux de HDL circulantes proche de 0 g/L (n=6 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ , test de Mann-Whitney). **(C)** La capacité de neutralisation du LPS des plasmas des souris naïves ou allogreffées, WT ou *ApoA1<sup>tm1Unc</sup>*, a été estimée à l’aide de cellules reportrices HEK-Blue TLR4/CD14/MD2. Les résultats ont été indexés sur le

pouvoir de masquage du plasma des souris naïves (n=3 souris/groupe). **(D)** La survie et le score clinique des souris allogreffées WT et *Apoa1<sup>tmUnc</sup>* ont été suivis quotidiennement WT (n=9-19 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test de Mantel-Cox ou test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn sur les aires sous la courbe). **(E)** La perméabilité intestinale a été évaluée *in vivo* par test au FITC-Dextran 10 jours après la transplantation (n=4-5 souris/groupe, \*  $p < 0,05$ , test de Mann-Whitney). **(F)** La présence de LPS dans le plasma des souris a été mesurée par technique Endoquant® et par dosage LAL (6 souris/groupe, 2 expériences indépendantes, \*\*  $p < 0,01$ , test de Mann-Whitney). L'index d'activité endotoxinique a été calculé comme le rapport entre l'activité (EU/mL) et le 3HM total (nmol/mL) (123).

Le transport inverse fait intervenir les lipoprotéines circulantes, tout particulièrement les HDL, comme transporteurs du cholestérol ou des LPS de la périphérie vers le foie. Ainsi, le taux de HDL circulantes peut constituer un frein à la neutralisation et à l'élimination efficaces des LPS. Afin de tester cette hypothèse dans le contexte de la GVHa, la concentration de HDL-cholestérol a été mesurée dans le plasma des souris receveuses (modèle C57Bl/6 → BALB/c) 6 jours après la greffe (**Figure 7A**). Si le taux plasmatique de HDL des souris ayant reçu des LT syngéniques ( $1,06 \pm 0,03$  g/L) est proche des valeurs physiologiques ( $1,21 \pm 0,04$  g/L pour les souris naïves), il apparait effondré dans les souris ayant reçu des LT allogéniques ( $0,24 \pm 0,02$  g/L). Afin de confirmer l'impact de la concentration de HDL circulantes, des souris WT ou n'exprimant pas APOA-I, l'apolipoprotéine principale des HDL (*Apoa1<sup>tmUnc</sup>*, (196)) ont reçu une greffe allogénique (C3H) et le HDL-cholestérol a été dosé dans leur plasma à J+6 (**Figure 7B**). La diminution du taux circulant de HDL après alloCH a été confirmée dans le modèle C3H → C57Bl/6 ( $0,47 \pm 0,08$  g/L contre  $0,82 \pm 0,02$  g/L dans le plasma des souris syngéniques). Conformément aux résultats attendus avec la mutation du gène codant APOA-I, la concentration plasmatique de HDL est quasiment nulle pour les souris receveuses *Apoa1<sup>tmUnc</sup>* ( $0,07 \pm 0,01$  g/L). Par ailleurs, l'absence de HDL circulantes est associée à une moindre capacité de neutralisation des LPS par le plasma (**Figure 7C**). En effet, le plasma des souris naïves *Apoa1<sup>tmUnc</sup>* semble moins apte à limiter l'activation des cellules HEK reportrices TLR4 par rapport aux souris naïves WT ( $0,71 \pm 0,02$  contre  $1 \pm 0,21$ ). Cette capacité semble encore davantage diminuée par l'allogreffe ( $0,33 \pm 0,12$ ). De plus, le défaut de synthèse des lipoprotéines et l'absence de HDL circulantes aggravent significativement la sévérité de la GVHa, tant au regard de la mortalité que du score clinique spécifique (**Figure 7D**). Cette altération de l'état général s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité intestinale, comme l'atteste la translocation *in vivo* de FITC-Dextran supérieure pour

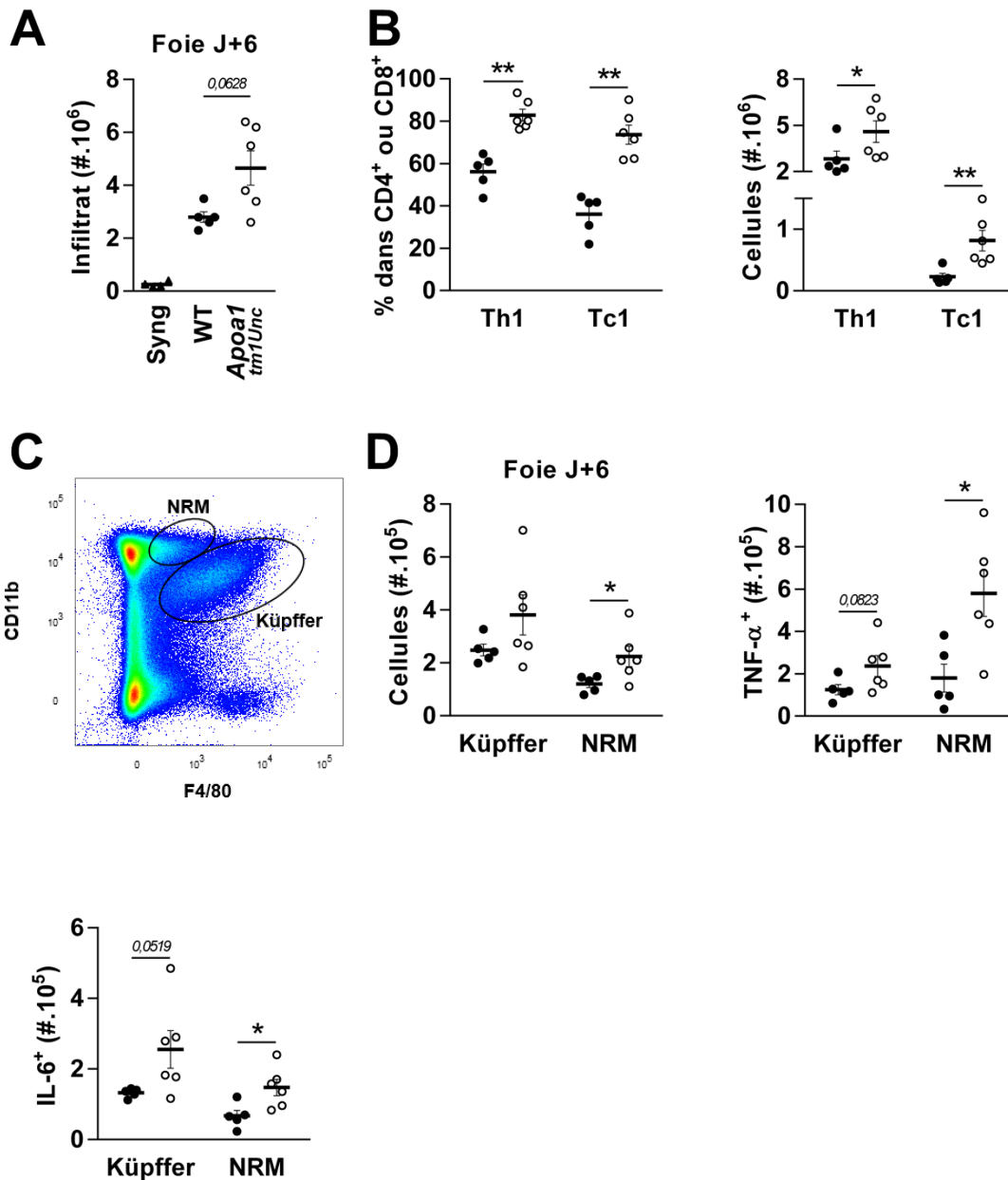
les souris allogreffées *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* ( $4,29 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport aux souris allogreffées WT ( $1,54 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ ) (**Figure 7E**). De façon surprenante, le dosage du 3HM dans le plasma des souris receveuses révèle une diminution des LPS circulants 6 jours après la transplantation pour les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* ( $224 \pm 35,7 \text{ pmol/mL}$ ) par rapport aux souris WT ( $514,2 \pm 52,9 \text{ pmol/mL}$ ) (**Figure 7F**). Toutefois, le dosage de l'activité endotoxinique par LAL ne révèle pas de différence entre les plasmas des souris WT et *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* ( $2,46 \pm 0,25$  et  $2,15 \pm 0,17 \text{ EU/mL}$ , respectivement). L'index d'activité, c'est-à-dire le rapport entre l'activité des LPS et leur concentration molaire (**123**), est supérieur pour les souris qui présentent un défaut de synthèse et une absence de HDL circulantes par rapport à des souris WT. Ainsi, il semble que les LPS soient moins bien neutralisés en absence de HDL dans un contexte de GVHa.

Afin d'évaluer l'impact du défaut d'expression d'APOA-I sur les réactions immunitaires, les DC CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>IA/IE<sup>+</sup> ont été quantifiées et leur maturation a été analysée dans la rate des souris receveuses 6 jours après la greffe (**Figures 8A, 8C**). Les DC sont plus nombreuses et expriment davantage les marqueurs de maturation CD80 et CD86 à leur surface pour les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* allogreffées par rapport aux souris WT allogreffées. Ainsi, en moyenne, il y a 1,7 fois plus de DC CD80<sup>+</sup> et 3,3 fois plus de DC CD86<sup>+</sup> parmi les splénocytes des souris présentant un défaut de synthèse et une absence de HDL. Par ailleurs, les souris allogreffées *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* présentent un nombre absolu de LT CD3<sup>+</sup> supérieur à celui des souris naïves à J+6 (**Figures 8B, 8D**). Ces LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sécrètent proportionnellement davantage d'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation non spécifique (phorbol-myristate-acétate/ionomycine), conduisant au doublement du nombre de lymphocytes Th1 ( $401 \pm 0,05 \cdot 10^3$  contre  $230 \pm 0,04 \cdot 10^3$  cellules) et Tc1 ( $1,23 \pm 0,13 \cdot 10^6$  contre  $0,61 \pm 0,15 \cdot 10^6$  cellules) dans la rate des souris n'exprimant pas APOA-I. Ainsi, ces résultats indiquent que l'absence de HDL circulantes dans le plasma des souris allogreffées conduit à une accélération de la maturation des DC et favorise la polarisation Th1/Tc1 des LT dans la rate.



**Figure 8 – Le défaut de synthèse des lipoprotéines et l’absence de HDL circulantes accélèrent la maturation des DC et favorisent la production d’IFN-γ par les LT de la rate.** La maturation des DC (A) et la polarisation des LT (B) ont été analysées par cytométrie en flux 6 jours après la transplantation dans la rate des souris allogreffées WT et *Apoa1*<sup>tm1Unc</sup>. (A) Le nombre cellulaire absolu de DC CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>IA-IE<sup>+</sup> est significativement supérieur dans la rate des souris *Apoa1*<sup>tm1Unc</sup>. Les DC des souris *Apoa1*<sup>tm1Unc</sup> expriment davantage les marqueurs de maturation CD80 et CD86 à leur surface par rapport à celle des souris WT, tant en pourcentage d’expression qu’en nombre absolu de cellules positives. La différence d’expression de CD86 à la surface des DC est illustrée en (C). (B) Le nombre absolu de LT CD3<sup>+</sup> est supérieur dans la rate des receveuses *Apoa1*<sup>tm1Unc</sup> par rapport à celui des receveuses WT. La proportion de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sécrétant de l’IFN-γ (respectivement Th1 et Tc1 pour LT cytotoxiques de type 1) est augmentée en absence de APOA-1 et représente un nombre absolu de cellules supérieur après 4h de stimulation phorbol-myristate-acétate/ionomycine. La sécrétion d’IFN-γ par les LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> est illustrée en (D) (n=11-12 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , test t non apparié ou test de Mann-Whitney).

Par ailleurs, le foie est un organe cible de la GVHa et le site majeur d'élimination du LPS transporté par les lipoprotéines plasmatiques. Son aspect apparaît particulièrement détérioré pour les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* ayant reçu des LT allogéniques (mauvaise perfusion sanguine, hépatomégalie, aspect tacheté). L'infiltrat de cellules immunitaires tend à être plus important pour ces souris ( $4,65 \pm 1,6 \cdot 10^6$  cellules contre  $2,8 \pm 0,2 \cdot 10^6$  cellules pour les souris WT), alors qu'il est quasiment absent dans la situation syngénique ( $0,26 \pm 0,05 \cdot 10^6$  cellules) (**Figure 9A**). Au sein de cet infiltrat, on observe une proportion accrue de LT sécrétant de l'IFN- $\gamma$  parmi les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et donc une augmentation significative du nombre absolu de LT polarisés vers un profil Th1 et Tc1 (**Figure 9B**). L'activation des macrophages hépatiques a également été analysée par cytométrie en flux. Les macrophages résidents, ou cellules de Küpffer (KC), ont été définis comme CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>low</sup> tandis que les macrophages non-résidents (NRM) ont été définis comme CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>high</sup> (**197**) (**Figure 9C**). Les NRM sont significativement plus nombreux dans le foie des souris déficientes pour APOA-I ( $2,24 \pm 0,4 \cdot 10^5$  contre  $1,21 \pm 0,1 \cdot 10^5$  cellules pour les souris WT) et sécrètent proportionnellement plus de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 en réponse à une stimulation LPS (**Figure 9D**). Les mêmes tendances sont retrouvées pour les KC sans que la différence entre les souris WT et *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* ne soit significative. Ces données suggèrent que le défaut de synthèse des lipoprotéines et l'absence de HDL circulantes favorisent un phénotype pro-inflammatoire des cellules immunitaires hépatiques.



**Figure 9 – Le défaut de synthèse des lipoprotéines et l’absence de HDL circulantes favorisent un phénotype pro-inflammatoire des cellules immunitaires hépatiques. (A)** Le nombre de cellules immunitaires a été évalué dans le foie des souris receveuses après isolement sur gradient de Percoll. **(B)** La polarisation des LT hépatiques a été analysée par cytométrie en flux 6 jours après la greffe. La proportion et le nombre absolu de LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sécrétant de l’IFN-γ (Th1 et Tc1 respectivement) sont supérieurs chez les souris *Apoa1<sup>tmUnc</sup>* par rapport aux souris WT après 4h de stimulation phorbol-myristate-acétate/ionomycine. **(C)** La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des cellules de Kupffer (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>high</sup>) et des macrophages non-résidents (NRM, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>low</sup>) du foie a été analysée par cytométrie en flux 6 jours après la transplantation après 4h de stimulation LPS. **(D)** Le nombre absolu de cellules de Kupffer et de NRM tend à être supérieur dans le foie des souris *Apoa1<sup>tmUnc</sup>*. Les NRM, et dans une moindre mesure les cellules de Kupffer, sont plus nombreux à produire du TNF-α et de l’IL-6 lorsque les souris présentent une absence de HDL circulantes (n=5-6 souris/groupe, \*  $p < 0,05$ , test de Mann-Whitney).



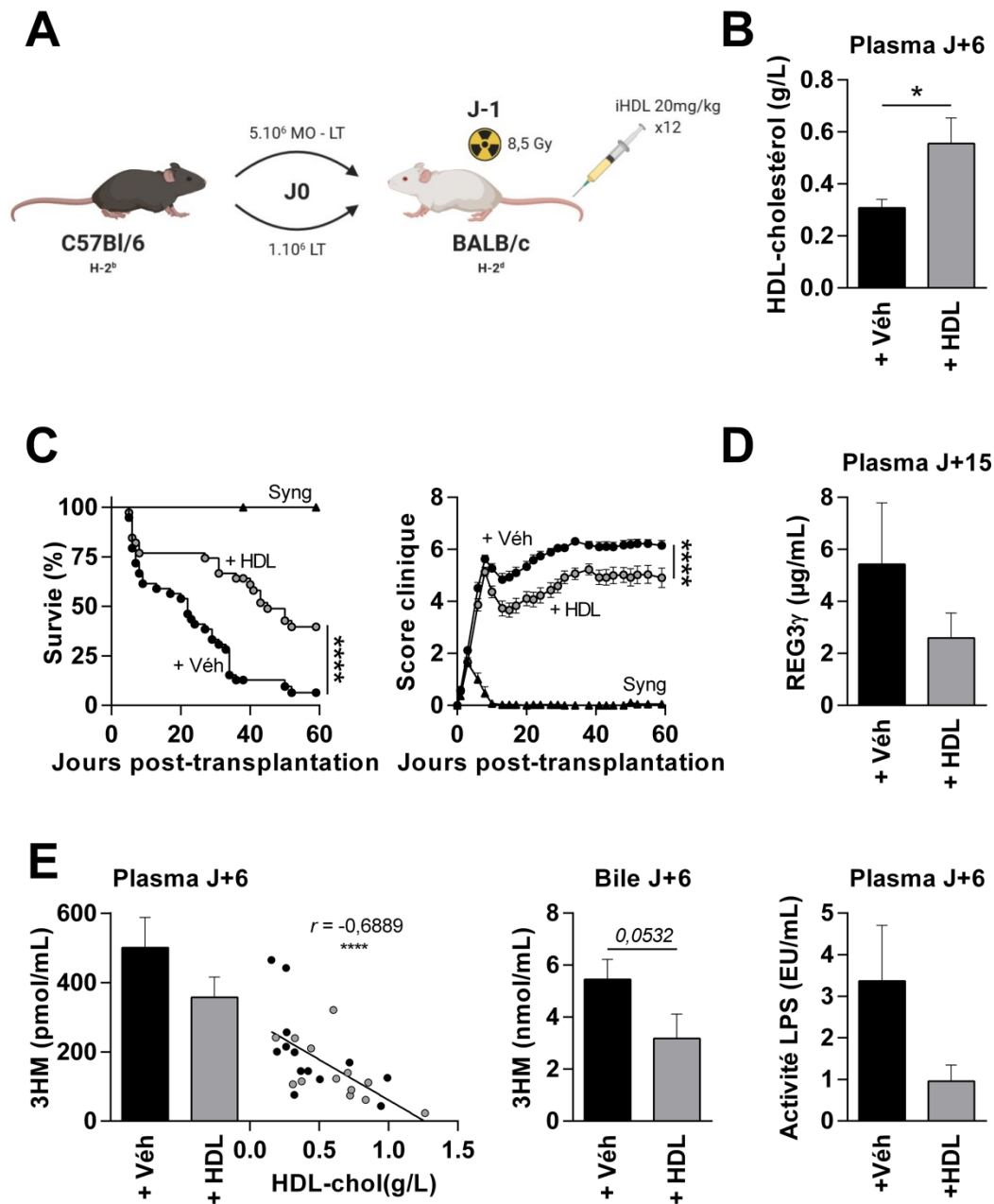
L'ensemble de ces résultats soutient l'hypothèse qu'il existe des liens entre le développement de la GVHa et le métabolisme des lipoprotéines. Il semble que l'efficacité de neutralisation par les HDL et d'élimination par le foie des LPS soit limitée dans le contexte de la GVHa par la disponibilité en HDL. En effet, la concentration de ces transporteurs est considérablement réduite lorsque les souris reçoivent des LT allogéniques et leur absence totale conduit à une aggravation de la pathologie et à une augmentation de marqueurs inflammatoires dans la rate et le foie des souris receveuses déficientes pour APOA-I.

### III. L'administration de HDL comme approche prophylactique de la GVHa

Les résultats précédents suggèrent que le taux de HDL circulantes est négativement impacté par l'alloCH et que leur absence complète (receveuses *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*) dans le plasma aggrave la mortalité, la sévérité et le statut inflammatoire des souris développant une GVHa. Ce constat a inspiré le développement d'une nouvelle approche thérapeutique, l'administration de HDL, visant à rétablir le taux de HDL circulantes, dans le but d'augmenter le RLT et de limiter l'inflammation induite par les LPS.

Des HDL ont été isolées à partir du plasma de donneurs sains par ultracentrifugations consécutives. Les souris receveuses allogreffées (modèle C57Bl/6 → BALB/c) ont reçu trois injections hebdomadaires de HDL isolées (iHDL) à raison de 20 mg de protéines/kg entre J-1 et J+24 autour de la transplantation par voie intraveineuse (**Figure 10A**). L'administration régulière de petites doses de iHDL permet de corriger, au moins en partie, les concentrations plasmatiques de HDL-cholestérol dès les premiers jours suivant l'allogreffe ( $0,56 \pm 0,1$  g/L contre  $0,31 \pm 0,03$  g/L pour les souris ayant reçu la solution contrôle [NaCl]) (**Figure 10B**). L'augmentation du taux de HDL circulantes s'accompagne d'un allongement de la médiane de survie (de 22 à 45 jours après la greffe) ainsi que d'une diminution significative du score clinique (**Figure 10C**). Ainsi, il apparaît que l'administration intraveineuse de iHDL protège partiellement les souris ayant reçu des LT allogéniques du développement d'une GVHa. Cette observation est confirmée par la tendance à la diminution du biomarqueur spécifique de GVHa digestive, REG3 $\gamma$ , dont la concentration est divisée par deux dans le plasma des souris traitées par iHDL (**Figure 10D**). Par ailleurs, l'administration de iHDL tend à diminuer la concentration de 3HM mesurée dans le plasma et la bile des souris allogreffées à J+6 (**Figure 10E**). Dans le plasma, la concentration de 3HM est diminuée en moyenne de 30% tandis que l'activité endotoxinique est également réduite pour les souris ayant reçu des iHDL ( $0,96 \pm 0,39$  EU/mL contre  $3,37 \pm 1,34$  EU/mL pour les souris recevant le véhicule). L'index d'activité endotoxinique est également réduit dans le plasma des souris traitées ( $3,77 \pm 1,31$  EU/pmol contre  $6,2 \pm 2,29$  EU/pmol, données non incluses), suggérant une amélioration de la

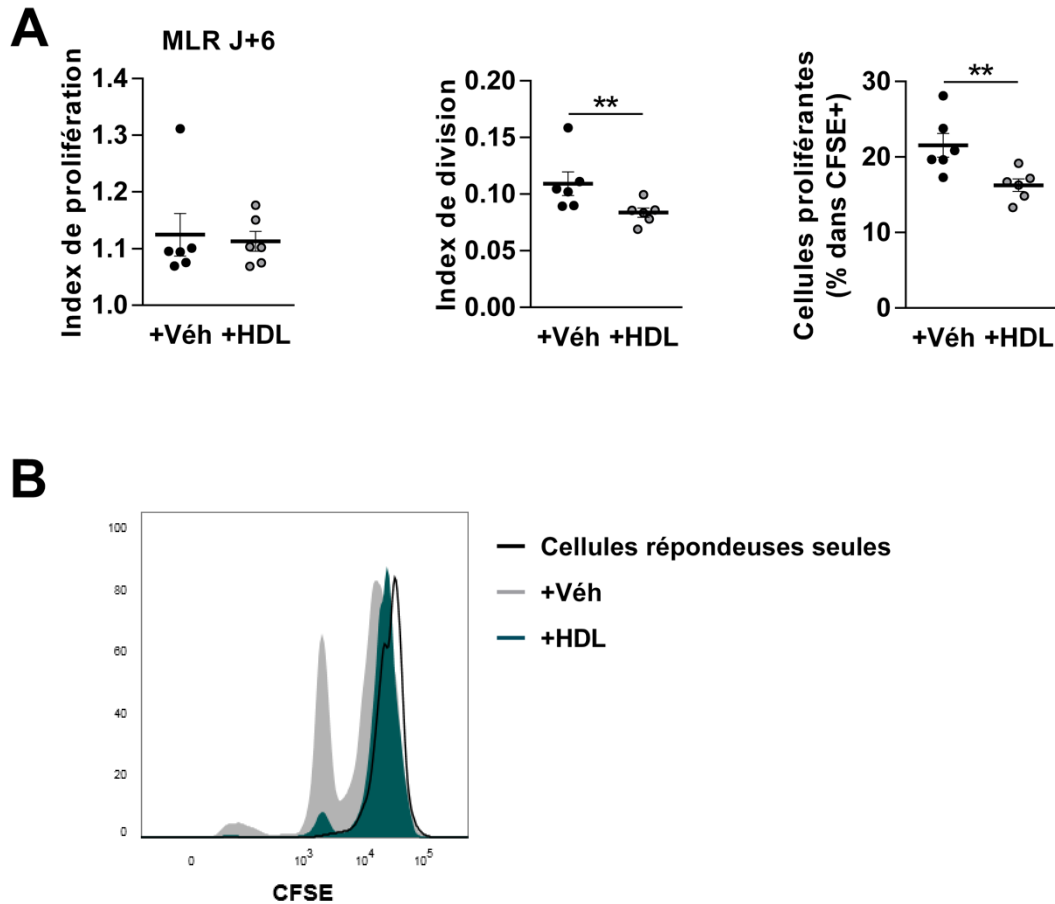
neutralisation des LPS avec l'administration de iHDL. De façon intéressante, la concentration en 3HM plasmatique est inversement corrélée au taux de HDL circulantes (**Figure 10E**). De la même façon, le 3HM mesuré dans la bile par technique Endoquant® semble diminuer avec l'administration de iHDL ( $3,18 \pm 0,94$  nmol/mL contre  $5,46 \pm 0,77$  nmol/mL pour les souris non traitées). Ce taux est également inversement corrélé avec la concentration de HDL circulantes ( $r = -0,7012$ ,  $p = 0,0008$ , données non incluses). Ces données considérées conjointement motivent l'administration de iHDL comme approche thérapeutique pour limiter le développement de la GVHa.



**Figure 10 – L’administration répétée de HDL isolées à partir de plasma humain permet de réduire significativement la sévérité de la GVHa. (A)** Des HDL ont été isolées (iHDL) par ultracentrifugations différentielles de plasma humain. Les souris allogreffées (modèle C57Bl/6 → BALB/c) ont reçu 12 injections intraveineuses de 20 mg/kg de iHDL (véhicule : NaCl 0,9%) réparties entre J-1 et J+24 autour de la greffe. **(B)** L’administration répétée de iHDL permet d’améliorer le taux de HDL circulantes mesuré à l’aide d’un automate Thermo Fischer Indiko (n=10-11 souris/groupe, 3 expériences indépendantes, \*  $p < 0,05$ , test de Mann-Whitney). **(C)** Le traitement des souris allogreffées par iHDL améliore leur survie et diminue la sévérité de la GVHa (n=19-39 souris/groupe, 4 expériences indépendantes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Mantel-Cox ou 1-way ANOVA et post-test de Bonferroni sur les aires sous la courbe). **(D)** La concentration de la protéine REG3γ a été dosée par méthode immuno-enzymatique dans le plasma des souris 15 jours après la transplantation (n=8 souris/groupe). **(E)** Le 3HM a été dosé dans le plasma et dans la bile des souris receveuses par technique Endoquant® 6 jours après la

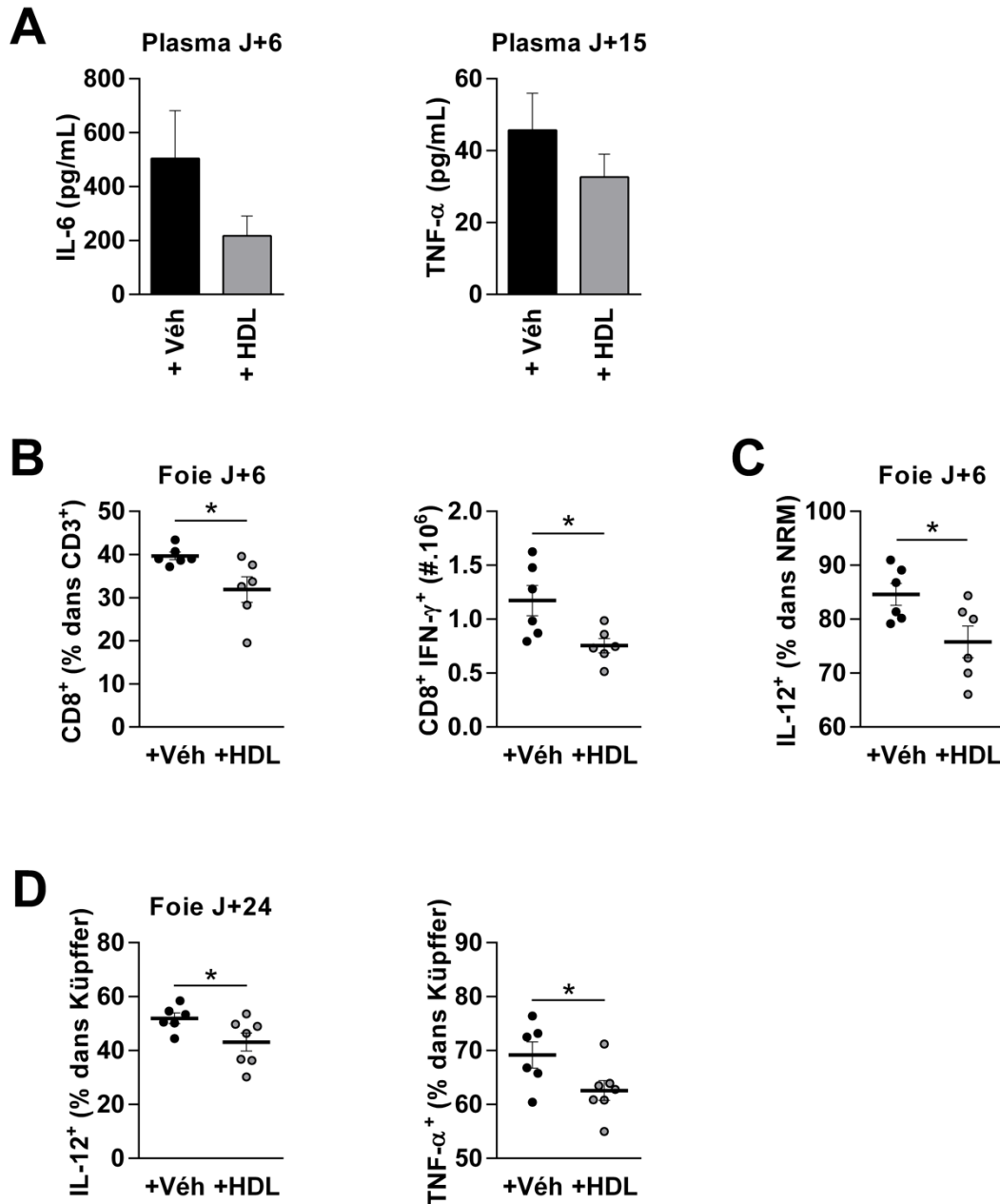
transplantation (n=9-13 souris/groupe, 4 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney). Le taux de 3HM plasmatique est inversement corrélé avec le taux de HDL circulantes (n=26 paires, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , test de corrélation non-paramétrique de Spearman). L'activité du LPS circulant a été mesurée 6 jours après la transplantation par dosage LAL (n=7-9 souris/groupe, 3 expériences indépendantes).

Afin de confirmer que la restauration du taux de HDL circulantes permet de réduire la sévérité de la GVHa et de limiter l'intensité des réponses allogéniques, nous avons testé *in vitro* la capacité des splénocytes des souris allogreffées, ayant reçu ou non des iHDL, à activer la prolifération de LT naïfs dans une réaction mixte lymphocytaire (MLR). Brièvement, des LT issus de souris C57Bl/6 naïves et marqués au CFSE ont été cultivés avec des splénocytes de souris receveuses (modèle C57Bl/6 → BALB/c) prélevés 6 jours après la greffe (**Figures 11A, 11B**). L'analyse de la dilution du marquage CFSE après 5 jours de co-culture ne révèle pas de différence de prolifération des LT C57Bl/6. Les LT activés par le contexte allogénique prolifèrent à la même vitesse que les splénocytes proviennent de souris ayant reçu ou non des iHDL (index de prolifération). En revanche, une proportion significativement inférieure de LT est activée et prolifère au contact des cellules de souris traitées (index de division de  $0,084 \pm 0,004$  contre  $0,11 \pm 0,01$  pour les souris ayant reçu le véhicule). Ainsi, le nombre de cellules ayant subi au moins une division au cours de la co-culture diminue d'environ 25% si les splénocytes proviennent d'une souris traitée par iHDL. L'administration intraveineuse de HDL semble donc limiter la capacité des splénocytes des souris traitées à induire des réactions allogéniques, ce qui pourrait participer à la diminution de la sévérité de la GVHa observée.



**Figure 11 – L’administration répétée de iHDL diminue la capacité des splénocytes à activer des LT naïfs *ex vivo*.** L’alloréactivité a été mesurée par réaction lymphocytaire mixte (*Mixed lymphocyte reaction*, MLR) 6 jours après la greffe. Brièvement, des LT naïfs issus de souris C57Bl/6 et marqués au CFSE ont été cultivés en présence de splénocytes issus des souris allogreffées traitées ou non par iHDL. La dilution du marquage CFSE a été analysée par cytométrie en flux après 5 jours de co-culture. **(A)** L’index de prolifération correspond au rapport entre le nombre total de divisions et le nombre de cellules CFSE<sup>+</sup> ayant proliféré. L’index de division est le rapport entre le nombre total de divisions et le nombre total de cellules CFSE<sup>+</sup> (n=6 souris/groupe, \*\*  $p < 0,01$ , test de Mann-Whitney). Des profils de proliférations des LT CFSE<sup>+</sup> en absence (cellules répondeuses seules) ou en présence de splénocytes issus de souris traitées (+HDL) ou non (+Véh) par iHDL sont représentés en **(B)**.

Les données précédentes suggèrent que l'administration de HDL pourrait participer à diminuer l'inflammation dans le contexte de la GVHa. Dans le plasma des souris allogreffées, l'administration de HDL semble limiter les concentrations de cytokines pro-inflammatoires circulantes (**Figure 12A**). Notamment, elle entraîne une diminution de moitié des concentrations d'IL-6 circulantes à J+6 ( $217,7 \pm 73$  contre  $504 \pm 177,8$  pg/mL), mais semble avoir un effet plus limité sur les concentrations de TNF- $\alpha$  à J+15. Le foie est un organe cible de la GVHa et possède un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines et l'élimination des LPS. Nous avons évalué l'effet de l'administration de iHDL sur les cellules immunitaires hépatiques par cytométrie en flux. Six jours après la transplantation, les LT CD8<sup>+</sup> représentent une moindre proportion des LT infiltrant le foie et sont moins aptes à sécréter de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une activation non spécifique (phorbol-myristate-acétate/ionomycine) lorsque les souris ont reçu des injections de lipoprotéines (**Figure 12B**). L'analyse de l'activation des APC dans le foie révèle que rapidement après la greffe (J+6), les NRM des souris traitées par HDL sécrètent significativement moins d'IL-12 en réponse à une stimulation LPS ( $75,8 \pm 2,9$  % de cellules positives contre  $84,6 \pm 2$  % pour les souris non traitées) (**Figure 12C**). Plus tardivement (J+24), ce sont les KC qui deviennent moins sensibles à la stimulation LPS et produisent moins d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  (**Figure 12D**). Ainsi, l'administration de HDL limite la production de signaux inflammatoires par les CPA dans le foie des souris allogreffées.



**Figure 12– L’administration répétée de iHDL semble limiter l’inflammation systémique et diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires dans le foie.** (A) Les concentrations d’IL-6 (n=6 souris/groupe) et de TNF-α (n=3 souris/groupe) ont été mesurées dans le plasma des souris allogreffées 6 ou 15 jours après la transplantation par méthode immuno-enzymatique. (B) La proportion de LT CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dans l’infiltrat immunitaire du foie ainsi que leur capacité à sécréter de l’IFN-γ (phénotype Tc1) ont été analysées 6 jours après la greffe par cytométrie en flux après 4h de stimulation phorbol-myristate-acétate/ionomycine. (C, D) La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages du foie a été analysée 6 jours et 24 jours après la greffe par cytométrie en flux après 4h de stimulation LPS. (C) La proportion de macrophages non-résidents du foie (NRM) sécrétant de l’IL-12 est diminuée par l’administration de iHDL précocement après la greffe. (D) L’administration de iHDL réduit également la proportion de cellules de Küpffer sécrétant de l’IL-12 et du TNF-α plus tardivement (J+24). (B, C, D : n=6 souris/groupe, \* p < 0,05, test de Mann-Whitney ou test t non apparié).

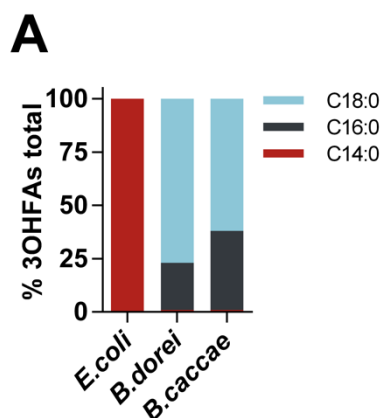


L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt de moduler le métabolisme des lipoprotéines et le transport inverse des LPS, tout particulièrement en amplifiant la concentration de HDL circulantes, pour prévenir le développement d'une GVHa après alloCH. L'administration régulière de faibles doses de HDL isolées à partir de plasma de donneurs sains apparaît comme une approche thérapeutique efficace pour limiter la mortalité et la sévérité de la GVHa dans le modèle C57Bl/6 → BALB/c. Cet effet protecteur est associé à une réduction des concentrations de 3HM plasmatique et biliaire, une diminution de la capacité des splénocytes à soutenir des réactions allogéniques et une moindre sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires hépatiques.

## IV. Résultats préliminaires

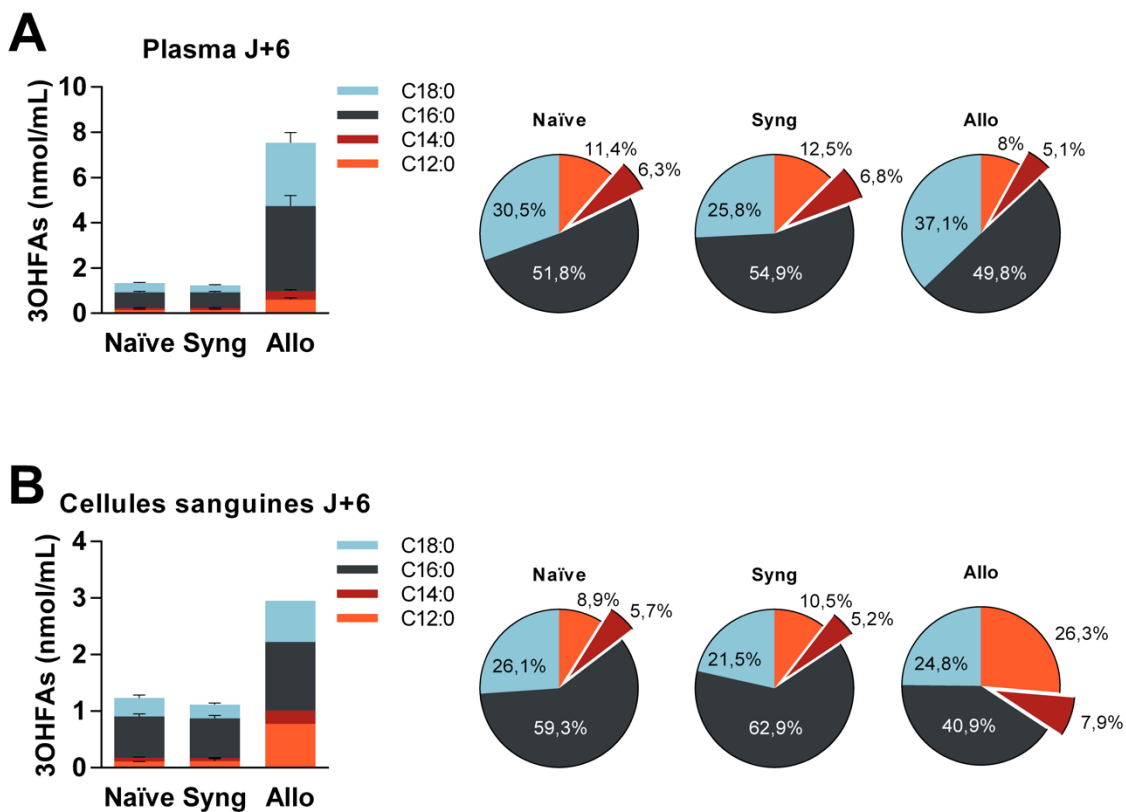
Dans un premier temps, nous avons pris le parti de limiter l'étude du métabolisme des LPS dans nos modèles expérimentaux de GVHa à l'analyse du 3HM, c'est-à-dire un acide gras hydroxylé à 14 carbones très répandu parmi les entérobactéries telles qu'*E. coli*. Toutefois, la technique Endoquant® permet de mesurer d'autres acides gras hydroxylés spécifiques des bactéries par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse : l'hydroxylaurate (C12:0), l'hydroxypalmitate (C16:0) et l'hydroxystéarate (C18:0). Les données présentées dans cette partie sont préliminaires et doivent être considérés avec précaution. La structure du lipide A de la plupart des entérobactéries n'est pas élucidée à l'heure actuelle, il est donc impossible de relier de façon certaine les longueurs de chaînes acyles à la prépondérance de certaines espèces.

Cependant, afin de mieux interpréter ces données, les LPS de différentes souches d'entérobactéries à Gram négatif ont été extraits par technique « *hot phénol-water* » et les différentes longueurs de chaînes acyles ont été dosées par Endoquant® (**Figure 13A**). La structure du lipide A d'*E. coli* est connue et contient principalement des chaînes de 3HM et d'hydroxylaurate. La prépondérance de 3HM est confirmée par le dosage des LPS extraits, mais le dosage par Endoquant® des chaînes à 12 carbones n'était pas encore mis au point au moment de ces expériences préliminaires. Nous avons souhaité comparer cette composition à celle de LPS décrits comme moins immunogènes voire antagonistes du LPS d'*E. coli*, comme *Bacteroides dorei* et *Bacteroides caccae* (**118**). L'analyse des LPS de ces deux dernières souches montre qu'ils contiennent exclusivement des chaînes hydroxypalmitate (22% pour *B. dorei* et 37% pour *B. caccae*) et des chaînes hydroxystéarate (77% et 62% respectivement). Ainsi, il apparaît que les LPS immunogènes contiendraient plutôt des chaînes à 12 et 14 carbones tandis que les LPS antagonistes contiendraient davantage de chaînes à 16 et 18 carbones.

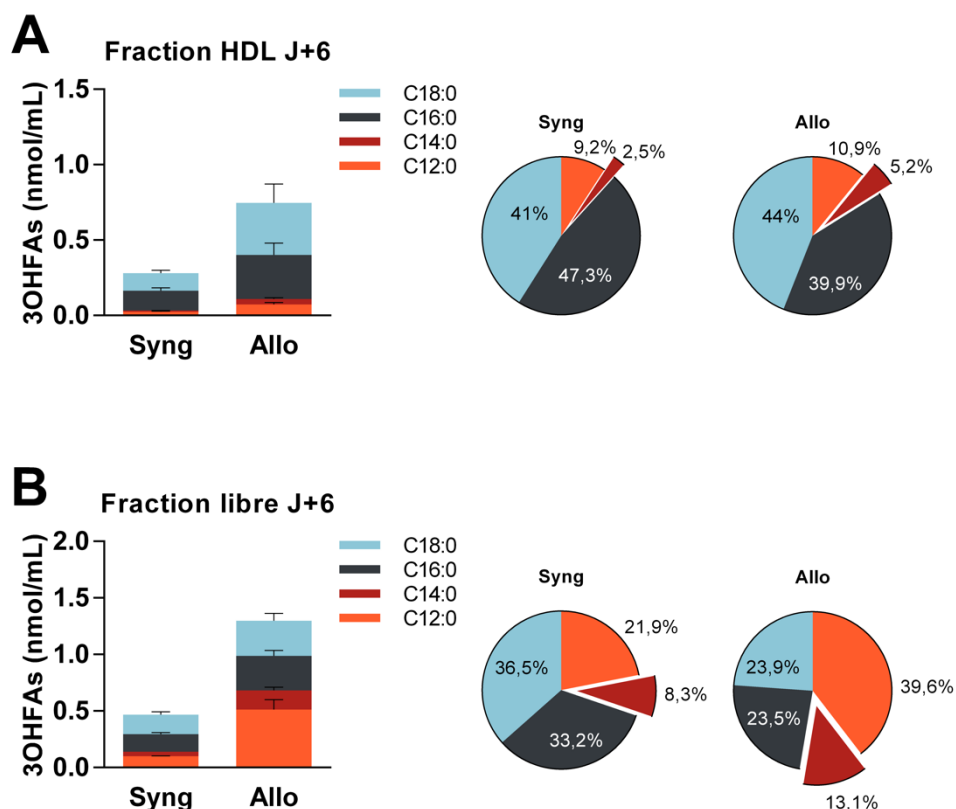


**Figure 13– Les bactéries intestinales expriment à leur surface des LPS contenant des chaînes acyles de différentes longueurs.** Afin de déterminer les longueurs des chaînes acyles du lipide A de *E. coli*, de *Bacteroides dorei* et de *Bacteroides caccae*, les différents LPS ont été extraits de colonies bactériennes par technique « *hot phenol-water* ». Les produits d'extraction ont ensuite été analysés par méthode Endoquant® (C12:0 = hydroxylaurate, C14:0 = hydroxymyristate, C16:0 = hydroxypalmitate, C18:0 = hydroxystéarate) (n=1 dosage Endoquant pour un *pool* de 3 extractions indépendantes).

Le dosage de chaque longueur de chaînes acyles dans le plasma de souris naïves ou ayant reçu des LT syngéniques ou allogéniques, 6 jours après la greffe, est représenté dans la **Figure 14A**. Outre l'augmentation de 3HM associée à l'alloCH décrite précédemment, il apparaît que la concentration de toutes les longueurs de chaînes acyles augmente pour les souris allogreffées. Le taux total moyen de LPS circulants est de  $7,54 \pm 0,26$  nmol/mL (contre  $1,24 \pm 0,02$  nmol/mL pour les souris ayant reçu des LT syngéniques). Toutefois, la proportion de chaque type de chaînes acyles parmi les LPS totaux est similaire entre les souris naïves, syngéniques et allogéniques. En revanche, si l'on considère les LPS présents dans le culot cellulaire, c'est-à-dire les LPS encore fixés aux bactéries transloquées dans la circulation et les LPS liés aux cellules immunitaires, l'augmentation de la concentration des différentes chaînes acyles s'accompagne d'une modification de leur répartition (**Figure 14B**). En effet, l'hydroxylaurate (C12:0) et le 3HM sont davantage représentés pour les souris ayant reçu des LT allogéniques (26,3% et 7,9% respectivement) par rapport aux souris ayant reçu des LT syngéniques (10,5% et 5,2% respectivement). Ainsi, il semble qu'en plus de l'augmentation du 3HM dans le plasma des souris allogreffées, la concentration des LPS liés aux bactéries entières et/ou liés aux cellules immunitaires augmentent également rapidement après la transplantation.



**Figure 14– La concentration des différentes longueurs de chaînes acyles est augmentée après alloCH dans le plasma mais également dans le culot cellulaire.** La technique Endoquant® a été utilisée pour déterminer les concentrations des différentes chaînes acyles dans le plasma **(A)** et dans les culots cellulaires **(B)** 6 jours après la transplantation (modèle C57Bl/6 → BALB/c). Si la concentration des différentes chaînes est augmentée après allogreffe dans le plasma et dans les cellules sanguines, la proportion qu'elles représentent reste inchangée dans le plasma. En revanche, la proportion de C12:0 mesurée dans les cellules sanguines est augmentée après allogreffe (n=3-24 souris/groupe de 1 [cellules sanguines] ou 3 [plasma] expériences indépendantes).



**Figure 15– Après alloCH, les chaînes C12:0 et C14:0 sont majoritaires parmi les LPS circulants libres.** Six jours après la transplantation (modèle C57Bl/6 → BALB/c), le plasma des souris a été séparé par ultracentrifugations séquentielles en une fraction liée aux HDL et une fraction libre (non liée aux lipoprotéines). La technique Endoquant® a été utilisée pour déterminer les concentrations des différents LPS dans la fraction HDL (**A**) et la fraction libre (**B**). La concentration de toutes les chaînes acyles est augmentée par l'allogreffe dans les deux fractions. Si la répartition des différentes longueurs est similaire dans la fraction liée aux HDL, les LPS contenant des chaînes C12:0 et C14:0 sont prépondérantes dans la fraction libre du plasma des souris ayant reçu une allogreffe par rapport à une greffe syngénique (n=3-4 souris/groupe).

Afin de mieux comprendre l'association des LPS aux HDL dans le contexte de la GVHa, le plasma des souris receveuses a été séparé par ultracentrifugations séquentielles. La concentration des différentes chaînes acyles a ensuite été dosée dans la fraction HDL (**Figure 15A**) et dans la fraction libre, non associée aux lipoprotéines (**Figure 15B**). Dans la fraction HDL, tous les types d'acides gras hydroxylés sont retrouvés en plus grande quantité pour les souris allogreffées, avec des proportions similaires à celles des souris syngéniques. Ceci laisse penser que les HDL incorporent toujours les mêmes proportions des différentes chaînes acyles. En revanche, la fraction libre du plasma de souris ayant reçu des LT allogéniques contient davantage de chaînes acyles C12:0 et C14:0 (plus de la moitié des LPS circulants), alors que ceux-ci représentent moins d'un tiers des LPS circulants pour les souris syngéniques. Ces LPS libres sont capables d'activer le système immunitaire et peuvent participer à l'initiation de la GVHa en agissant comme des signaux de danger.

L'ensemble de ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent qu'il est intéressant de doser les différents sous-types de LPS afin d'avoir une représentation globale de la translocation bactérienne. De plus, il apparaît que la réalisation de ce dosage dans différentes fractions du plasma permet de mieux appréhender le métabolisme des LPS circulants dans nos modèles murins de GVHa.

# **Discussion & Conclusion**

# Discussion et Conclusion

## I. Discussion des principaux résultats

L'augmentation des concentrations circulantes de LPS et ses effets pro-inflammatoires ont été décrits comme des signaux déclencheurs de GVHa depuis de nombreuses années **(92,110,138)**. Toutefois, peu de données ont été publiées sur leur prise en charge par l'organisme après le déclenchement de la GVHa. Ainsi, l'objectif principal de ces travaux était d'explorer le métabolisme des LPS, notamment son transport inverse, dans des modèles expérimentaux de GVHa afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

### 1. Étude du métabolisme des LPS dans un modèle murin de GVHa

Nous avons tout d'abord validé l'utilisation du modèle expérimental C57Bl/6 → BALB/c grâce au suivi du développement de la GVHa (mortalité et score clinique) et au dosage de biomarqueurs spécifiques. Ce modèle est couramment utilisé pour étudier la physiopathologie de la GVHa. Nos résultats sont similaires à ceux de Van Leuween et *al.* **(190)** qui proposent une ample description d'un modèle très similaire (nombre de cellules injectées supérieur sans tri des LT spléniques). Les cinétiques de survie, perte de poids et score clinique sont analogues à ce que nous avons pu observer. De plus, les auteurs confirment que les symptômes spécifiques de la GVHa apparaissent très rapidement (J+7 après la transplantation). A ce temps précoce, les signes cliniques ne sont pas imputables au seul conditionnement, car ils sont absents dans les groupes contrôles ayant reçu une ICT mais pas de LT allogéniques. Nous avons également confirmé dans ce modèle la perte d'intégrité de l'épithélium intestinal et l'exposition systémique aux LPS associées au développement d'une GVHa. Un pic de 3HM a été mis en évidence dans le plasma des souris du groupe allogénique 6 jours après la greffe. Hill et son équipe **(92)** avaient également montré une élévation précoce du LPS à J+7 dans le modèle B6 → B6D2F1 avec forte dose d'ICT. Dans des modèles murins moins agressifs, les LPS sont détectés dans le plasma plus tardivement (J+16 dans le



modèle « parent-enfant » C57Bl/6 → B6AF1), suggérant que la cinétique d'exposition au LPS peut varier en fonction de l'intensité de la GVHa.

Par ailleurs, nous utilisons ici une technologie innovante pour la détection des LPS dans les fluides biologiques : la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (technique Endoquant® développée par Laurent Lagrost et son équipe (123)). Cette technique robuste et offrant une grande reproductibilité de résultats permet de s'affranchir de certains défauts de la méthode historique de dosage des LPS au LAL. En effet, le dosage par spectrométrie de masse n'est pas dépendant de la structure des lipides A (le LAL ne réagit pas à tous les LPS) et ne produit pas de faux-positifs (le LAL peut réagir aux molécules « *lipid A-like* » qui ne sont pas des LPS) (198). Nous avons montré une élévation des LPS totaux (par Endoquant®), de l'activité endotoxinique (par dosage au LAL), ainsi que de la forme soluble de CD14 (192). En plus de confirmer l'exposition précoce des souris receveuses aux LPS, la méthode Endoquant® permet de quantifier les LPS dans les différentes fractions du plasma séparées par ultracentrifugations (fraction liée aux HDL ou fraction libre, non liée aux lipoprotéines). Ces données sont précieuses pour mieux comprendre la prise en charge des LPS dans le contexte de la GVHa. En effet, l'augmentation des LPS plasmatiques observée à J+6 est principalement causée par des LPS libres, suggérant qu'ils sont moins bien neutralisés chez les souris ayant reçu des LT allogéniques. De ce fait, nous avons concentré la suite de notre étude sur le métabolisme des lipoprotéines et le RLT qui sont les principales voies de neutralisation et d'élimination des LPS.

## 2. Modulation des effecteurs du transport inverse des LPS

La procédure d'alloCH semble affecter négativement le RLT. Il a déjà été démontré que la réponse inflammatoire pouvait inhiber le transport inverse du cholestérol. Par exemple, l'inflammation peut diminuer l'expression des transporteurs du cholestérol, modifier la qualité, la taille et/ou la capacité à prendre en charge le cholestérol des HDL. Le contexte inflammatoire peut également limiter l'assimilation et l'excrétion du cholestérol par le foie (199,200). Toutefois, ces études utilisent des modèles murins d'inflammation induite par des composés bactériens (LPS ou zymosan), il est donc difficile de conclure sur la modulation du RCT par les signaux de danger ou par la

réponse inflammatoire elle-même. Des études complémentaires dans des modèles d'inflammation aseptique seraient nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes. La modulation des effecteurs du RCT par l'inflammation a été illustrée chez l'homme. L'analyse du plasma de patients avant (phase pré-inflammatoire) et après (phase inflammatoire) une chirurgie cardiaque révèle des modifications quantitatives et qualitatives des HDL **(201)**. Afin de mettre en évidence la composante du RLT qui pouvait limiter la neutralisation et/ou l'élimination des LPS au cours de la GVHa, trois types de modulation ont été proposés : l'administration d'UDCA, l'absence de PLTP (PLTP<sup>-/-</sup>) et l'absence de HDL (APOA-I<sup>tm1Unc</sup>).

L'UDCA est utilisé en clinique pour la prévention des toxicités hépatiques de la procédure d'allogreffe. Dans une étude prospective randomisée, son administration est associée à une diminution de l'incidence de la GVHa sévère, une réduction de la mortalité non associée à la rechute à un an (19% chez les patients ayant reçu de l'UDCA contre 34% dans le groupe contrôle) et une amélioration significative de la survie globale **(202)**. Toutefois, son mécanisme d'action après alloCH n'a pas encore été mis en évidence.

Plusieurs effets de l'UDCA pourraient intervenir dans la modulation du RLT et dans la physiopathologie de la GVHa. Tout d'abord, l'UDCA a des effets cholérétiques **(203)**, c'est-à-dire qu'il fluidifie et accélère la sécrétion biliaire. L'UDCA possède également un rôle hépato-protecteur car il remplace les acides biliaires hydrophobes toxiques pour le foie **(204)**. Il a également été montré que l'UDCA pouvait moduler la réponse inflammatoire en diminuant les concentrations circulantes de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  par un mécanisme dépendant du récepteur aux glucocorticoïdes dans des modèles expérimentaux d'hépatite et d'endotoxémie **(205)**. Dans notre étude, l'administration d'UDCA aux souris allogreffées avait pour but d'explorer ce mécanisme d'action et notamment de préciser si l'accélération du flux biliaire pouvait potentialiser l'élimination des LPS. Toutefois, dans le modèle de GVHa C57Bl/6  $\rightarrow$  BALB/c, l'administration d'UDCA *per os* ou par voie intrapéritonéale n'a pas montré d'effet significatif sur la survie des souris ou sur la sévérité de la GVHa. Au contraire, le traitement *per os* semble plutôt délétère, sans doute à cause de la répétition de l'administration par sonde pouvant fragiliser le tube digestif.

Schwarzenberg et Bundy ont montré que l'administration prophylactique d'UDCA diminuait la translocation de LPS à travers la muqueuse intestinale et réduisait la

production subséquente de TNF- $\alpha$  chez les rats nouveau-nés **(206)**. Les travaux de l'équipe de Yamamoto suggèrent que l'UDCA exerce un effet protecteur sur les endotoxémies induites par injection de LPS. Au contraire, dans les modèles d'infection bactérienne, l'UDCA, en diminuant la réponse inflammatoire, aggraverait la mortalité des souris **(205)**. Le contexte de la GVHa correspond à la présence dans la circulation générale à la fois de LPS et de bactéries vivantes **(101)**, des études plus approfondies sont donc nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'UDCA dans le contexte de la GVHa.

La PLTP est un effecteur clé dans le transport inverse des LPS car elle favorise leur chargement sur les HDL par son activité de transfert des composés lipidiques **(156)**. Nous avons montré dans ces travaux que l'activité PLTP plasmatique était diminuée par l'ICT (groupe syngénique et allogénique) précocement après la greffe. Par ailleurs, le retour à un index d'activité physiologique semble plus lent chez les souris allogreffées. Afin d'évaluer l'importance de cette protéine dans le contexte de la GVHa, une greffe allogénique a été réalisée chez des souris PLTP<sup>-/-</sup>. L'absence d'activité PLTP n'entraîne pas d'aggravation de la sévérité de la GVHa du point de vue de la mortalité et du score clinique. Il semble ainsi que l'activité PLTP, bien que diminuée après alloCH, puisse être suffisante à assurer le transfert des LPS et ne constitue pas un facteur limitant du RLT au cours de la GVHa. Toutefois, Deckert et *al.* ont récemment montré que l'administration de PLTP recombinante pouvait améliorer la survie dans des modèles murins de sepsis **(169)**. Cette approche pourrait également avoir des effets bénéfiques dans le contexte de la GVHa, car la PLTP, en plus de participer à la neutralisation des LPS, aurait une action bactéricide directe en formant des pores à la surface des bactéries.

Ainsi, la diminution de la neutralisation et/ou de l'élimination des LPS ne semble imputable ni à un défaut de l'excrétion biliaire, ni à un défaut d'activité de transfert de la PLTP. Le facteur limitant pour un transport inverse efficace au cours de la GVHa semble plutôt être la disponibilité des transporteurs des LPS : les HDL. En effet leur concentration plasmatique est effondrée chez les souris allogreffées dans les premiers jours suivant la greffe et leur absence totale (receveuses allogéniques *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*) aggrave la sévérité de la GVHa.

De façon surprenante, le défaut de synthèse des lipoprotéines et l'absence de HDL circulantes sont associés à un taux circulant de LPS total inférieur par rapport aux souris WT. Toutefois, le dosage de l'activité des LPS par la technique LAL montre que l'activité endotoxinique mesurée dans les plasmas n'est pas différente que les souris expriment ou non la protéine APOA-I, suggérant que le LPS surnuméraire chez les souris WT serait masqué par les HDL ou par un autre mécanisme. Il est possible que le défaut de HDL soit pondéré par des mécanismes de compensation, fréquemment observés chez les souris génétiquement modifiées (207), mais pas encore mis en évidence chez les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* à ce jour. Il est également possible que le pic de LPS détecté dans le plasma des souris WT à J+6 après la transplantation soit plus précoce lorsque les souris présentent un défaut de synthèse des lipoprotéines et une absence complète de HDL. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le métabolisme des LPS chez les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*.

Par ailleurs, l'aggravation de la GVHa pour les receveuses n'exprimant pas APOA-I est corroborée par l'augmentation de marqueurs d'activation immunitaire dans la rate et dans le foie. Notamment, l'absence de HDL circulantes entraîne une accélération de la maturation des DC et une augmentation de la polarisation Th1/ Tc1 des LT par rapport aux souris allogreffées WT dans la rate. Dans le foie, la mutation de APOA-I augmente le nombre de cellules immunitaires infiltrant les tissus après alloCH (LT et macrophages notamment). De plus, ces cellules produisent davantage de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-6) chez les souris *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* que chez les souris WT. Zhang et *al.* ont déjà démontré que les CPA hépatiques jouaient un rôle primordial dans le recrutement de LT CD8<sup>+</sup> et que la déplétion conjointe des CPA du foie et de la rate permettait de réduire la sévérité de la GVHa hépatique (208). Nos résultats suggèrent que les macrophages non-résidents (NRM) sont particulièrement impliqués. Il s'agit de macrophages dérivés de monocytes et recrutés par la réaction inflammatoire (209). Toutefois, le phénotype de ces cellules mériterait d'être précisé car il pourrait également exister une colonisation du foie par des cellules de Küpffer dérivées de monocytes. En effet, l'environnement créé par les cellules hépatiques stellaires, les hépatocytes et les cellules endothéliales peut favoriser le recrutement et la reprogrammation de monocytes circulants en cellules de Küpffer (210,211). Le modèle dynamique proposé par ces deux études suggère la complexité des réactions immunitaires au niveau hépatique et il apparaît alors nécessaire de préciser le phénotype des différentes populations impliquées dans notre modèle de GVHa.

### 3. L'administration de HDL comme approche prophylactique de la GVHa

Les effets péjoratifs de l'absence de HDL circulantes, tant au niveau systémique qu'immunitaire, suggèrent l'impact de ces lipoprotéines sur la physiopathologie de la GVHa. C'est pourquoi nous avons exploré le potentiel thérapeutique de l'injection de HDL pour prévenir et/ou traiter la survenue de la GVHa chez les souris allogreffées. La source de HDL choisie était des lipoprotéines isolées à partir de plasma humain (donneurs sains) par ultracentrifugations successives sur gradient de bromure de potassium (iHDL). Cette technique est peu coûteuse et aisée à mettre en œuvre. Toutefois, la composition lipidique des HDL, le statut inflammatoire du donneur, la technique de préparation et les conditions de stockage sont des paramètres importants qui peuvent influencer la structure et la fonction des HDL. En effet, l'oxydation des HDL, leur taille ou le remplacement de APOA-I par une protéine de phage aiguë de l'inflammation, SAA pour *Serum amyloid A*, peuvent modifier les propriétés anti-inflammatoires des HDL (212,213).

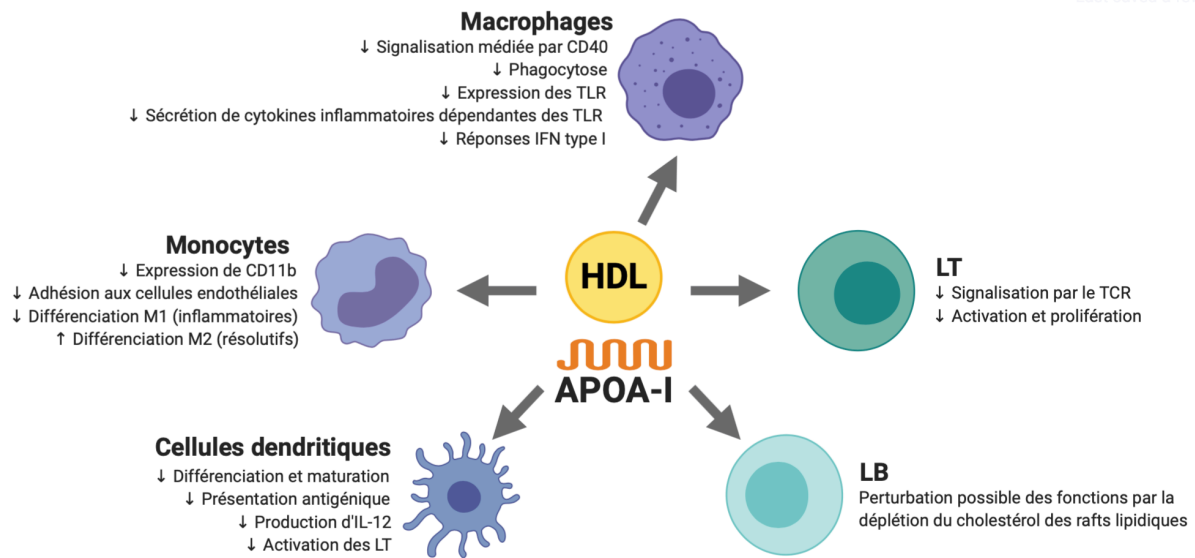
Pour éviter ces biais, Van der Vost et *al.* suggèrent (214) :

- i) d'utiliser des lots de HDL issus de plusieurs donneurs et/ou plusieurs séparations
- ii) de vérifier la fonctionnalité des iHDL (par exemple, par un test d'efflux du cholestérol. Dans notre étude, il pourrait s'agir d'un test de masquage de l'activité endotoxinique mesuré à l'aide des cellules HEK reportrices TLR4)
- iii) d'utiliser des préparations récentes
- iv) de comparer plusieurs sources de HDL (cf. § Perspectives : Alternatives pour augmenter le taux de HDL circulantes).

Afin d'assurer une qualité optimale des iHDL, nous avons systématiquement combiné les produits d'extraction de deux donneurs pour constituer les lots de iHDL, limité au maximum le temps avant leur congélation à -80°C et vérifié la composition protéique par électrophorèse en conditions dénaturantes. L'étude citée ci-dessus (214) propose cependant des contrôles supplémentaires qui nous permettraient de valider la fonctionnalité des iHDL avant leur utilisation *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons formulé l'hypothèse que l'administration de iHDL devait encadrer le pic de LPS circulants, identifié dans le plasma des souris 6 jours après la transplantation, afin d'assurer au mieux son élimination. Dans des expériences non développées dans ce mémoire, les souris ont été traitées par des doses importantes (40, 80 ou 100 mg/kg) de iHDL par voie intraveineuse encadrant (J+4, J+6, J+8) ou précédant (J+1, J+3, J+5) le pic de LPS plasmatique. Aucune de ces modalités de traitement n'a montré d'amélioration sur la survie ou le score clinique des souris allogreffées. La stratégie de traitement a alors été réorientée vers une supplémentation longue en iHDL dans le but de rétablir durablement les taux circulants de ces lipoprotéines. L'administration de doses moins importantes (20 mg/kg) mais régulières (3 injections par semaine) pendant une période s'étendant du conditionnement par ICT (première injection reçue plusieurs heures avant la séance d'ICT) jusqu'à 24 jours après la greffe, a permis une diminution significative de la mortalité et de la sévérité de la GVHa chez les souris allogreffées. Cette modalité de traitement permet de couvrir partiellement le déficit en HDL dès J+6. Néanmoins, elle n'est associée qu'à une tendance à la diminution des LPS plasmatiques et biliaires dosés par spectrométrie de masse. L'administration de iHDL semble avoir davantage d'impact sur l'activité des LPS circulants qui est réduite au même taux que celui des souris syngéniques. Aussi, il est possible qu'à ce temps précoce (J+6), les LPS soient effectivement pris en charge par les HDL mais qu'ils n'aient pas été transportés vers le foie. Un dosage des LPS par Endoquant® dans les fractions libre et liée aux HDL du plasma de souris traitées par iHDL pourrait répondre à cette hypothèse.

La réduction de la concentration et de l'activité des LPS circulants n'est que partielle, et semble ainsi insuffisante pour expliquer l'effet notable de l'administration de iHDL sur la mortalité et la sévérité de la GVHa. Il est possible que les effets bénéfiques observés soient imputables à d'autres propriétés anti-inflammatoires des HDL. En plus de la neutralisation de l'activité biologique des LPS, les HDL transportent les lipides oxydés et ils limitent la réaction inflammatoire des cellules endothéliales (215). Les HDL modulent également les réponses des cellules de l'immunité innée et adaptative (216). Ces effets sont résumés dans la **Figure O**.



**Figure O – Les HDL et APOA-I exercent des effets spécifiques sur les cellules de l’immunité innée et adaptative.** Les HDL et leur apolipoprotéine de structure possèdent des propriétés anti-inflammatoires directes sur les réponses du système immunitaire. D’après : Catapano *et al.*, 2014 (216)

Ainsi, au moins une partie des effets bénéfiques observés lors de l’administration de iHDL aux souris receveuses d’une allogreffe pourraient être dus à l’activation du RCT et non du RLT. Par exemple, l’équipe de Tontonoz a montré que l’accumulation de cholestérol dans les CPA CD11c<sup>+</sup> augmentait leur capacité de présentation de l’antigène et la production de BAFF et APRIL (facteurs de différenciation des LB), participant au développement de syndromes auto-immuns (217). De la même façon, Westerterp *et al.* ont observé que les souris déficientes pour les transporteurs du cholestérol ABCA1 et ABCG1 étaient prédisposées au développement de glomérulonéphrites auto-immunes. Aussi, l’accumulation de cholestérol dans les cellules dendritiques participe à l’activation de l’inflammasome et à la production de cytokines pro-inflammatoires (218). Ainsi, bien que les taux de LPS (plasmatiques et biliaires) soient inversement corrélés, de façon significative, à la concentration de HDL circulantes, il est possible que la déplétion en cholestérol des CPA participe également à prévenir le développement de la GVHa dans notre modèle.

Par ailleurs, Van der Vost *et al.* ont mis en évidence un effet pro-inflammatoire des HDL sur les macrophages qui pourrait être bénéfique au cours des infections bactériennes. En effet, la déplétion passive en cholestérol des macrophages murins et humains par les HDL augmente la réponse immunitaire innée et participe à la clairance

bactérienne **(219)**. Cependant, cet effet activateur des HDL sur les macrophages, s'il existe dans le contexte de la GVHa, tendrait plutôt à favoriser l'alloréactivité et/ou le rejet du greffon par le receveur. Or, nous n'avons pas constaté ces phénomènes dans nos expériences.

Ainsi, les mécanismes d'action de l'administration de HDL dans notre modèle de GVHa restent à préciser, mais il apparaît que l'augmentation de la concentration de HDL circulantes :

- limite la capacité des cellules immunitaires à soutenir des réactions allogéniques, comme le montre la moindre prolifération de LT naïfs cultivés en présence de splénocytes de souris traitées par iHDL par rapport à des splénocytes de souris non traitées ;
- diminue l'inflammation systémique ainsi que la production de marqueurs inflammatoires dans le foie. L'administration de iHDL diminue l'infiltration de LT CD8<sup>+</sup> et leur production d'IFN- $\gamma$ , et limite l'activation et la production de cytokines pro-inflammatoires des deux sous-populations de CPA hépatiques testées.

Cette étude devra être complétée par l'analyse du phénotype des lymphocytes circulants et spléniques. Il serait également intéressant d'évaluer l'effet de l'administration de iHDL sur la présence et la fonctionnalité de cellules immuno-régulatrices pouvant limiter la sévérité de la GVHa. En effet, il a déjà été montré *in vitro*, dans un contexte non inflammatoire, que les HDL pouvaient favoriser la survie des LTregs **(220)**.

Si cette approche est originale dans la prophylaxie de la GVHa, des effets anti-inflammatoires protecteurs des HDL ont déjà été décrits *ex vivo* dans le sang total de patients cirrhotiques **(215)**, *in vivo* dans des modèles d'athérosclérose **(221)** et d'arthrite rhumatoïde **(222)**.

Ainsi, l'administration répétée de iHDL offre une protection contre le développement de la GVHa pour les souris ayant reçu des LT allogéniques. Cette protection n'est que partielle et ne saurait assurer une prophylaxie efficace à elle-seule. En revanche, cette approche pourrait être utilisée en complément des stratégies d'immunosuppression existantes. L'administration de HDL, en limitant la réponse inflammatoire, pourrait ainsi offrir la possibilité de diminuer les doses d'immunosuppresseurs prophylactiques, et ainsi limiter, d'une part, leur toxicité directe et, d'autre part, les risques de rechute et



d'infection associés au défaut de reconstitution immunitaire qu'ils induisent. Par ailleurs, associer l'administration de HDL avec d'autres stratégies pourrait potentialiser ses effets dans nos modèles expérimentaux (administration d'UDCA, de PLTP recombinante... voir aussi § Perspectives : Alternatives pour augmenter le taux de HDL circulantes).

#### 4. Résultats préliminaires

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse pour le dosage des LPS dans les fluides biologiques offre un éclairage nouveau pour mieux comprendre leurs métabolismes. En effet, en dosant la concentration de différentes chaînes acyles caractéristiques des LPS bactériens et en permettant cette mesure dans différentes fractions du plasma, la technique Endoquant® permet d'apprécier l'endotoxémie de façon plus complète.

Les travaux de Vatanen et son équipe proposent que les LPS issus de différentes souches d'entérobactéries ont des propriétés plus ou moins pro-inflammatoires **(118)**. Les auteurs suggèrent, par ailleurs, que la présence de certaines bactéries, notamment les bactéries dont le LPS a un fort pouvoir immunogène comme *E. coli*, dans le microbiote de nouveau-nés limite le développement de maladies auto-immunes en participant à l'« éducation » du système immunitaire. Ils mettent également en évidence les propriétés antagonistes des LPS des bactéries du phylum *Bacteroidetes*. Par exemple, le LPS de *B. dorei* inhibe la réaction inflammatoire de monocytes humains stimulés avec du LPS de *E. coli* de manière dose-dépendante. Au cours de la GVHa, il a été décrit que la dysbiose intestinale favorisait l'émergence d'*E. coli* au détriment des bactéries des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* **(101,223)**. Nous avons essayé de déterminer si la longueur des chaînes acyles de ces LPS et leur capacité à activer le système immunitaire pouvait être corrélées. Nos résultats d'extraction et de quantification des chaînes acyles par Endoquant®, bien que préliminaires, suggèrent que les LPS contenant des chaînes C12:0 et C14:0 (*E. coli*) seraient davantage inflammatoires et immunogènes tandis que les chaînes C16:0 et C18:0 (*B. dorei*, *B. caccae*) seraient moins aptes à déclencher des réponses inflammatoires.

Les concentrations des 4 longueurs de chaînes acyles sont augmentées dans le plasma des souris ayant reçu des LT allogéniques 6 jours après la transplantation, sans modification de leurs proportions respectives par rapport aux souris syngéniques. Cependant, il est intéressant de compléter le dosage plasmatique par un dosage des LPS dans le culot cellulaire, qui contient les LPS fixés sur les cellules immunitaires mais aussi les bactéries entières. Dans le culot, la concentration de toutes les longueurs de chaînes est augmentée avec l'alloCH mais la proportion des chaînes « pro-inflammatoires » (notamment C12:0) est également augmentée. Cette proportion suggère que cette longueur de chaîne est davantage prise en charge par les cellules immunitaires et/ou davantage représentée dans les bactéries traversant l'épithélium intestinal lésé.

Toutefois, ces données sont à considérer avec précaution car les longueurs des chaînes acyles du lipide A ne sont pas le seul facteur influençant l'immunogénicité des LPS. De plus, les acides gras hydroxylés dosés par spectrométrie de masse, notamment les chaînes C16:0 et C18:0, peuvent provenir des bactéries mais peuvent également être produites au cours de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras **(224,225)**. Néanmoins, les concentrations mesurées dans le plasma des souris receveuses dans notre modèle sont bien plus élevées que les valeurs considérées dans l'étude de Szponar et son équipe (plusieurs nmol/mL contre quelques pmol/mL), laissant penser que la  $\beta$ -oxydation seule ne pourrait être responsable de telles augmentations dans nos observations.

Enfin, le dosage des LPS dans les différentes fractions du plasma des souris receveuses séparées par ultracentrifugations révèle que les chaînes C12:0 et C14:0 deviennent prépondérantes dans la fraction libre du plasma des souris ayant reçu des LT allogéniques (plus de 50% du total) par rapport à celles ayant reçu des LT syngéniques (moins de 30%). Cette observation est associée à une augmentation de l'activité des LPS mesurée par test LAL. Ainsi, le dosage des LPS dans les fractions plasmatiques associées ou non aux lipoprotéines apparaît comme un outil de choix pour évaluer la neutralisation de l'activité endotoxinique et comprendre le métabolisme des LPS dans le contexte de la GVHa.

## 5. Différences du métabolisme lipidique murin et humain

Une limite globale de ces travaux est l'existence de différences dans le métabolisme des lipides chez la souris et chez l'homme. La différence majeure est l'absence totale d'expression de la CETP chez la souris. La CETP assure le transfert d'esters de cholestérol des  $\alpha$ HDL vers les particules riches en APOB (VLDL, IDL et LDL) en échange de triglycérides (154). En absence d'expression plasmatique de CETP, les lipoprotéines majeures pour le transport du cholestérol chez la souris sont les HDL. Chez l'homme, une partie de ce transport est assurée par les LDL.

Cette différence peut aussi influencer le RLT car les LPS peuvent également être pris en charge par les LDL voire être transférés des HDL vers les LDL. Chez les patients atteints d'un syndrome inflammatoire systémique, les LPS se retrouvent d'ailleurs majoritairement liés aux LDL plutôt qu'aux HDL (174). Le devenir des LPS associés aux LDL est peu décrit dans la littérature car l'affinité de liaison LPS-LDL est inférieure à l'affinité LPS-HDL (159). S'il semble que cette liaison neutralise également l'activité endotoxinique, des études montrent que la liaison des LPS modifie la charge des LDL et ralentit leur élimination (226,227). Toutefois, ces données sont peu étayées et des expérimentations supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre les cinétiques d'association des LPS aux LDL et leur élimination.

Des modèles de souris transgéniques ont été développés pour exprimer la CETP et l'APOB humaines et présentent une distribution des lipoprotéines circulantes plus proche de celle de l'homme (228). Nous pourrions utiliser ces souris dans nos modèles de GVHa afin de refléter plus fidèlement les conditions du RCT et du RLT chez l'homme. Cependant, il a été démontré que l'administration de LPS diminuait l'expression de la CETP plasmatique chez les souris transgéniques et chez l'homme (229). Par ailleurs, Venancio et *al.* ont démontré, dans des modèles expérimentaux de sepsis induits par ligature/ponction du caecum, que la CETP avait plutôt un impact bénéfique sur la survie des souris en diminuant l'expression de TLR4 au niveau hépatique et les taux circulants d'IL-6 (230). Ainsi, bien que les mécanismes mis en jeu dans les modèles de sepsis puissent être différents de ceux de la GVHa, il semble que l'expression de la CETP aurait plutôt un effet bénéfique et n'invaliderait pas nos résultats antérieurs. Dans tous les cas, l'ensemble des données recueillies dans nos

modèles expérimentaux de GVHa devra être confirmé chez l'homme. Une étude clinique est en cours de mise en place : MetAlloLip pour « *Lipopolysaccharide metabolism and identification of potential biomarkers predictive of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation* » (NCT03918343). Cette étude vise notamment à déterminer si des paramètres du métabolisme des LPS (dosage par Endoquant®, index d'activité, activité PLTP...) pourraient constituer des marqueurs prédictifs précoces de GVHa.

## II. Perspectives

### 1. Alternatives pour augmenter le taux de HDL circulantes

D'autres approches pourraient être envisagées pour augmenter la concentration et/ou la fonctionnalité des HDL circulantes. Tout d'abord, au lieu d'isoler des HDL à partir de plasma humain, il est possible de reconstituer des HDL à partir d'APOA-I purifiée ou recombinante et de lipides sélectionnés (souvent des phospholipides de soja). L'intérêt principal de cette stratégie est de pouvoir moduler la composition des particules reconstituées afin d'en améliorer les capacités de transport et d'obtenir un produit stable, sans variations inter-donneurs **(231)**. Plusieurs entreprises se sont intéressées à la production de formes reconstituées de HDL. Par exemple, l'efficacité du produit CSL-112 de CSL Behring est actuellement étudiée dans la prévention des complications cardiovasculaires chez des patients atteints d'un syndrome coronarien au cours d'un essai clinique de phase 3 (NCT03473223). Il existe d'autres stratégies pour augmenter la concentration de HDL circulantes. Les principales approches sont les activateurs de la formation et/ou de la maturation des HDL et les mimétiques de APOA-I. Ces stratégies sont listées de manière non exhaustive dans la **Table J**.

Stratégie	Exemple	Référence
<b>Induction de APOA-I</b>	Les fibrates sont des agonistes du facteur de transcription PPAR- $\alpha$ ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\alpha</math></i> ) et activent la transcription d'APO-AI. (232)	
	Des agonistes synthétiques puissants de PPAR- $\alpha$ ont également été développés, par exemple le LY518674 ou le RVX-208. (233,234)	
<b>Augmentation de l'efflux du cholestérol vers les HDL</b>	Les agonistes LXR favorisent le RCT en activant la transcription de nombreux gènes associés (notamment ABCA1 ou ABCG1). (235)	
	Le traitement avec des antagonistes du microARN-33 permet également une augmentation du RCT en levant l'inhibition d'expression de ABCA1. (236)	
<b>Maturation des HDL</b>	L'administration de LCAT recombinante normalise le profil lipidique chez l'homme et la souris. (237)	
<b>Augmentation de la formation des HDL</b>	L'administration de peptides mimant APOA-I permet de mobiliser le cholestérol périphérique pour former des particules <i>HDL-like</i> . (238)	

**Table J – La concentration de HDL circulantes peut être augmentée par différentes approches.** Les principales stratégies sont l'induction de l'expression de APOA-I, l'augmentation du RCT ou l'augmentation de la maturation/formation des HDL. D'après : Remaley et al., 2014 (239)

Tall et son équipe ont récemment suggéré que l'utilisation d'inhibiteurs de la CETP permettait d'augmenter le taux circulant de HDL et que cela pourrait constituer une piste thérapeutique pour la prévention de l'athérosclérose (240). Toutefois, comme décrit ci-dessus, il a été démontré que dans un contexte d'infection multi-bactérienne, comme c'est le cas au cours de la GVHa, cette stratégie pouvait être contre-productive car la CETP limite l'inflammation induite par les LPS (230).

Une autre stratégie consiste à réduire le catabolisme des HDL, par exemple en utilisant de la niacine (241) ou des inhibiteurs de SR-B1 (242). Cependant, les répercussions sur le RLT ne sont pas connues et ces stratégies ne seront donc pas développées ici.

Ainsi, il existe plusieurs approches visant à augmenter le taux de HDL circulantes. Il serait intéressant d'identifier le ou les mécanismes à l'origine de l'effondrement de la concentration plasmatique et de la diminution de fonctionnalité des HDL dans notre

modèle de GVHa afin de mettre en place la stratégie de compensation la plus adaptée. De plus, le protocole d'administration des iHDL décrit dans ces travaux a été établi de façon empirique et il serait nécessaire d'optimiser les protocoles d'extraction, de conservation et d'administration du produit.

## **2. Effet GVL ?**

Notre étude devra être complétée en considérant l'effet de l'administration de HDL sur l'effet GVL. En effet, les modèles expérimentaux que nous avons utilisé ne sont pas entièrement représentatifs de la situation clinique, notamment car il n'y a pas de composante leucémique. Or, il est nécessaire de s'assurer qu'un traitement montrant une efficacité sur la GVHa ne limite pas par ailleurs l'effet anti-leucémique de l'administration de LT allogéniques. Plusieurs modèles d'injection de cellules leucémiques suivies d'une procédure d'alloCH ont déjà été décrits et ont été développés dans notre laboratoire (243). Par ailleurs, des travaux antérieurs ont montré que la restauration de l'efflux du cholestérol par des agonistes LXR dans des cellules dendritiques plasmacytoïdes leucémiques limite leur prolifération et favorise leur apoptose (244). Nous pouvons ainsi poser l'hypothèse que l'augmentation du RCT par les HDL pourrait également avoir des effets anti-leucémiques dans nos modèles d'alloCH.

## **3. Lésions hépatiques de la GVHa : rôles sur les transporteurs hépatiques du cholestérol/des LPS ?**

Le foie est un organe central dans le métabolisme des LPS et également une des cibles principales de la GVHa. Nous allons prochainement, en collaboration avec un anatomopathologiste, préciser les lésions histologiques hépatiques dans nos modèles. L'analyse sur coupes minces de l'infiltration immunitaire, de l'apoptose des hépatocytes, de la fibrose des tissus et de la présence de lésions hémorragiques nous permettra également d'évaluer l'impact de l'administration de iHDL sur les lésions hépatiques de GVHa.

Aussi, il a été démontré que l'inflammation et la présence de signaux de danger pouvait réguler négativement le transport inverse (Cf. § 1.2. Modulation des effecteurs du transport inverse des LPS), notamment en inhibant l'expression de transporteurs impliqués dans l'excrétion biliaire du cholestérol (ABCG5, ABCG8, ABCB1) (199). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact du développement de la GVHa sur l'expression de ces transporteurs.

#### 4. Exploration des liens entre LPS, IL-22 et ILC

Enfin, une extension plus transversale de ces travaux pourrait s'intéresser aux liens qui existent entre LPS, IL-22 et ILC au niveau de l'intestin au cours de la GVHa. En effet, il a été démontré que l'IL-22 jouait un rôle central dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Cependant, au cours de la GVHa, cette cytokine possède un rôle ambivalent. La majeure partie de l'IL-22 est produite par les LT allogéniques et active les réponses inflammatoires locales (93,243). Toutefois, le maintien d'une production d'IL-22 par les cellules intestinales du receveur, notamment les ILC3, a un effet protecteur sur le développement de la GVHa intestinale (245). Dans un modèle d'infection par le *simian immunodeficiency virus*, l'équipe de Veazey a démontré que la translocation de LPS pouvait entraîner une diminution du nombre d'ILC3. En effet, en provoquant l'augmentation de l'expression de TLR2 et TLR4 à leur surface, le LPS prédisposerait les ILC3 à l'apoptose induite par la liaison de ligands de TLR2/4 (246). Ainsi, l'augmentation précoce des taux de LPS circulants pourrait participer à la déplétion des ILC3 et ainsi favoriser indirectement le développement de la GVHa intestinale. Le développement de ces hypothèses pourrait élégamment compléter l'étude présentée ici.

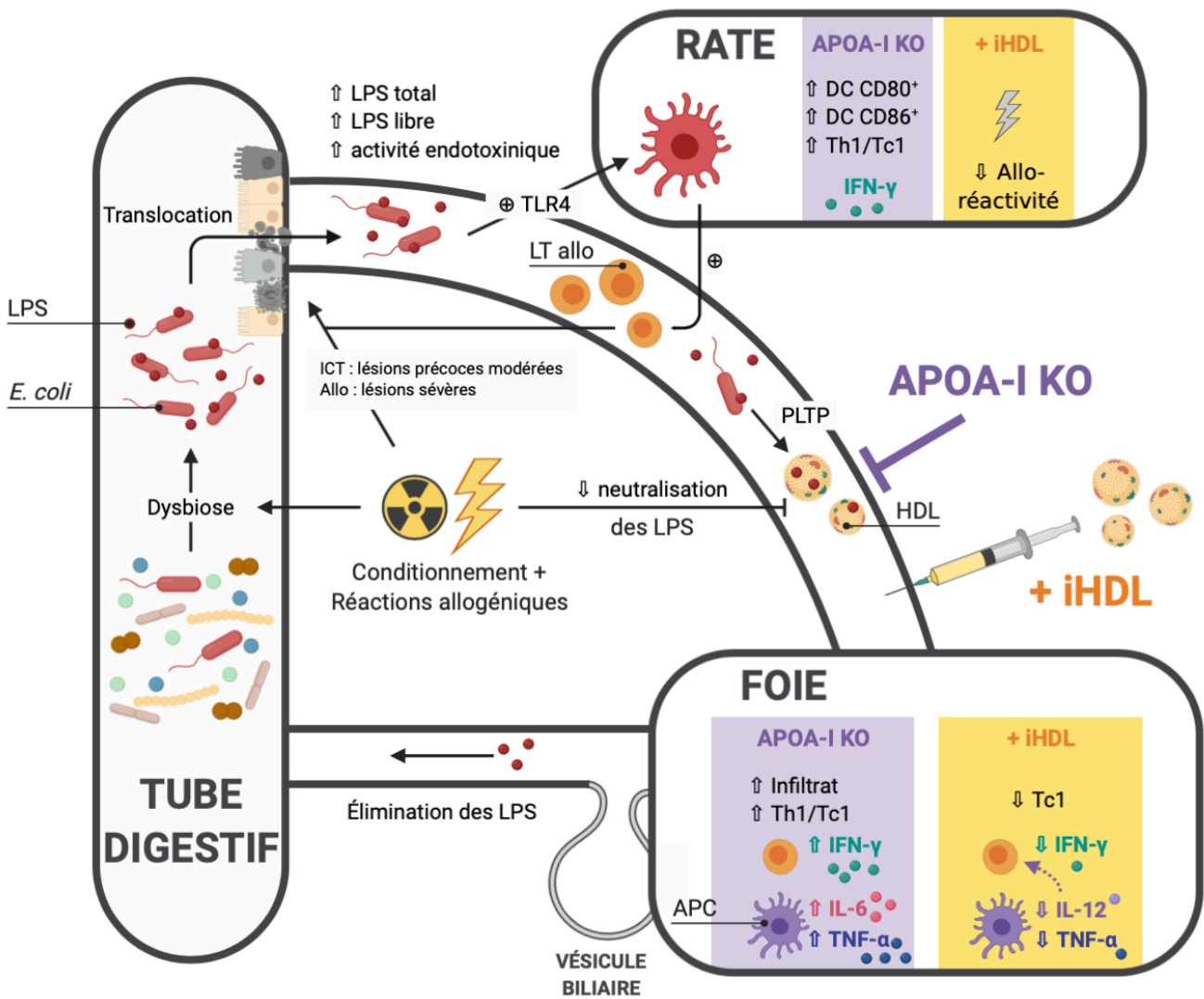


### **III. Conclusion générale**

La GVHa est une complication sévère de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques. Les options thérapeutiques sont actuellement limitées à la corticothérapie et les formes cortico-réfractaires restent des impasses thérapeutiques. Il est donc important de poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de la GVHa afin de proposer de nouvelles approches.

Des travaux suggèrent que les signaux de danger endogènes et exogènes modulent l'état d'activation des DC, et par ce biais, l'activation des lymphocytes T allogéniques. Dans ce contexte, nous avons étudié les LPS (des PAMP déjà impliqués dans la physiopathologie de la GVHa) dans des modèles expérimentaux, à l'aide d'une technique innovante de quantification. Nous avons confirmé l'élévation des LPS libres circulants et constaté que les voies de neutralisation et d'élimination des LPS semblaient moins efficaces au cours de la GVHa. En effet, le transport inverse des LPS semble limité par la diminution de la concentration des HDL circulantes. Cette hypothèse a été confirmée à l'aide d'un modèle de souris receveuses déficientes pour APOA-I où l'absence totale de HDL accroît la mortalité, le score clinique, l'activation immunitaire et l'inflammation hépatique et systémique. Ce constat a suggéré une approche thérapeutique originale : l'administration de HDL isolées permet de limiter les réponses allogéniques, la réaction inflammatoire hépatique et améliore significativement la survie et le score clinique des souris allogreffées traitées. Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont synthétisés dans la **Figure P**.

Ces travaux ouvrent de nombreuses questions quant au rôle du métabolisme des lipides et des lipoprotéines sur les réponses immunitaires de la GVHa, et notamment sur les propriétés anti-inflammatoires – non attribuables au RLT – des HDL.



**Figure P – Vue d’ensemble des résultats obtenus dans des modèles expérimentaux de GVHa.** Cette figure synthétise les principaux résultats développés dans ce mémoire sur l’exploration du métabolisme des LPS dans le contexte de la GVHa, l’effet de la déplétion totale en HDL (APOA-I KO) et l’administration de iHDL.

# Bibliographie

# Bibliographie

1. Passweg JR, Baldomero H, Basak GW, Chabannon C, Corbacioglu S, Duarte R, et al. The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Oct;54(10):1575–85.
2. Agence de Biomédecine. Rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France [Internet]. 2017. Available from: <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2017/donnees/cellules/04-national/synthese.htm>
3. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Impact of drug development on the use of stem cell transplantation: a report by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant*. 2017 Feb;52(2):191–6.
4. Archbold JK, Ely LK, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, Rossjohn J, McCluskey J, et al. T cell allorecognition and MHC restriction--A case of Jekyll and Hyde? *Mol Immunol*. 2008 Feb;45(3):583–98.
5. Mullighan CG, Petersdorf EW. Genomic polymorphism and allogeneic hematopoietic transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan;12(1 Suppl 1):19–27.
6. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2019 Nov 7]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5>
7. van den Brink MRM, Velardi E, Perales M-A. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:215–9.
8. Dubois V, Alizadeh M, Bourhis JH, Etancelin P, Farchi O, Ferrand C, et al. [Chimerism analysis after hematopoietic cell transplantation: Guidelines from the Francophone Society of bone marrow transplantation and cellular therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer (Paris)*. 2017 Dec;104(12S):S59–64.
9. D'Souza A, Fretham C. Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): CIBMTR Summary Slides [Internet]. 2018. Available from: <https://www.cibmtr.org>
10. Miller HK, Braun TM, Stillwell T, Harris AC, Choi S, Connelly J, et al. Infectious Risk after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Complicated by Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):522–8.
11. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. 2016 Aug;22(8):505–14.
12. Cohen EP, Pais P, Moulder JE. Chronic kidney disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Nephrol*. 2010 Nov;30(6):627–34.
13. Norvell JP. Liver disease after hematopoietic cell transplantation in adults. *Transplant Rev Orlando Fla*. 2015 Jan;29(1):8–15.
14. Vigorito AC, Campreggher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem H-P, et al. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):702–8.
15. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet Lond Engl*. 2009 May 2;373(9674):1550–61.

16. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Jun;15(6):825–8.
17. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, et al. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Jan;22(1):4–10.
18. Zeiser R, Blazar BR. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med.* 2017 30;377(22):2167–79.
19. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2012 Jan 5;119(1):296–307.
20. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966 1967;62:21–78.
21. van Dicke KA, Hooft JI, van Bekkum DW. The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. II. Mouse spleen cell fractionation on a discontinuous albumin gradient. *Transplantation.* 1968 Jul;6(4):562–70.
22. Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G, Gilmore MJ, Price-Jones L, Tidman N, et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet Lond Engl.* 1984 Mar 3;1(8375):472–6.
23. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D, Guyotat D, Rio B, Pico JL, et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet Lond Engl.* 1987 Jul 25;2(8552):175–8.
24. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells Dayt Ohio.* 1996 Sep;14(5):473–89.
25. Koyama M, Hill GR. Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: fuel for the fire. *Blood.* 2016 16;127(24):2963–70.
26. 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 May 1;95(9):2754–9.
27. Zeiser R, Socié G, Blazar BR. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation. *Br J Haematol.* 2016 Oct;175(2):191–207.
28. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don ALJ, et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2011 Nov 29;18(1):135–42.
29. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science.* 1999 Jul 16;285(5426):412–5.
30. New JY, Li B, Koh WP, Ng HK, Tan SY, Yap EH, et al. T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Jun;29(12):979–86.
31. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood.* 2005 Jun 1;105(11):4191–9.
32. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994 Jul 22;265(5171):528–30.

33. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*. 1994 Aug 25;370(6491):650–2.
34. van den Brink MRM, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):273–81.
35. Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med*. 2014 Jun;20(6):648–54.
36. Klämbt V, Wohlfeil SA, Schwab L, Hülsdünker J, Ayata K, Apostolova P, et al. A Novel Function for P2Y2 in Myeloid Recipient-Derived Cells during Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Dec 15;195(12):5795–804.
37. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003 Sep;9(9):1144–50.
38. Serafini G, Andreani M, Testi M, Battarra M, Bontadini A, Biral E, et al. Type 1 regulatory T cells are associated with persistent split erythroid/lymphoid chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. *Haematologica*. 2009 Oct;94(10):1415–26.
39. Simonetta F, Alvarez M, Negrin RS. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2017;8:465.
40. Coman T, Rossignol J, D'Aveni M, Fabiani B, Dussiot M, Rignault R, et al. Human CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology*. 2018;7(11):e1470735.
41. Malard F, Labopin M, Chevallier P, Guillaume T, Duquesne A, Riolland F, et al. Larger number of invariant natural killer T cells in PBSC allografts correlates with improved GVHD-free and progression-free survival. *Blood*. 2016 Apr 7;127(14):1828–35.
42. D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, et al. G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015 Apr 1;7(281):281ra42.
43. Legoff J, Resche-Rigon M, Bouquet J, Robin M, Naccache SN, Mercier-Delarue S, et al. The eukaryotic gut virome in hematopoietic stem cell transplantation: new clues in enteric graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2017 Sep;23(9):1080–5.
44. Zhao X-S, Huang X-J. Seeking biomarkers for acute graft-versus-host disease: where we are and where we are heading? *Biomark Res*. 2019;7:17.
45. Ferrara JLM, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011 Dec 15;118(25):6702–8.
46. Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, Ritz J, Ho VT, Antin JH, et al. ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N Engl J Med*. 2013 Aug 8;369(6):529–39.
47. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, et al. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood*. 2018 21;131(25):2846–55.
48. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Apr;43(8):643–53.
49. Platzbecker U, Ehninger G, Bornhäuser M. Allogeneic transplantation of CD34+ selected hematopoietic cells--clinical problems and current challenges. *Leuk Lymphoma*. 2004 Mar;45(3):447–53.

50. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013 Nov 13;5(211):211ra157.
51. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*. 1990 Oct 15;76(8):1464–72.
52. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, 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 J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2002;8(7):387–94.
53. Betts BC, Yu X-Z. Editorial: Pathogenesis and Therapy of Graft-versus-Host Disease. *Front Immunol*. 2019;10:1797.
54. Carniti C, Gimondi S, Vendramin A, Recordati C, Confalonieri D, Bermema A, et al. Pharmacologic Inhibition of JAK1/JAK2 Signaling Reduces Experimental Murine Acute GVHD While Preserving GVT Effects. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Aug 15;21(16):3740–9.
55. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2062–8.
56. Florek M, Sega EI, Leveson-Gower DB, Baker J, Müller AMS, Schneidawind D, et al. Autologous apoptotic cells preceding transplantation enhance survival in lethal murine graft-versus-host models. *Blood*. 2014 Sep 11;124(11):1832–42.
57. Yalniz FF, Hefazi M, McCullough K, Litzow MR, Hogan WJ, Wolf R, et al. Safety and Efficacy of Infliximab Therapy in the Setting of Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2017 Sep;23(9):1478–84.
58. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):390–9.
59. Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Nov 1;106(9):3300–7.
60. DeFilipp Z, Peled JU, Li S, Mahabamunuge J, Dagher Z, Slingerland AE, et al. Third-party fecal microbiota transplantation following allo-HCT reconstitutes microbiome diversity. *Blood Adv*. 2018 10;2(7):745–53.
61. Qi X, Li X, Zhao Y, Wu X, Chen F, Ma X, et al. Treating Steroid Refractory Intestinal Acute Graft-vs.-Host Disease With Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study. *Front Immunol*. 2018;9:2195.
62. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Crawford JM, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 1996 Oct 15;88(8):3230–9.
63. Eriguchi Y, Uryu H, Nakamura K, Shimoji S, Takashima S, Iwasaki H, et al. Reciprocal expression of enteric antimicrobial proteins in intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2013 Oct;19(10):1525–9.
64. Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li W, Turner MJ, Liu C, et al. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015 Oct 7;7(308):308ra160.

65. Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Mar 1;172(5):2731–8.
66. Socié G, Blazar BR. Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*. 2009 Nov 12;114(20):4327–36.
67. Schroeder MA, DiPersio JF. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech*. 2011 May;4(3):318–33.
68. Zeiser R, Blazar BR. Preclinical models of acute and chronic graft-versus-host disease: how predictive are they for a successful clinical translation? *Blood*. 2016 23;127(25):3117–26.
69. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar;14(3):141–53.
70. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2013 Feb;70(4):631–59.
71. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun 25;12(7):503–16.
72. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Oct;12(5):319–30.
73. Esterházy D, Canesso MCC, Mesin L, Muller PA, de Castro TBR, Lockhart A, et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature*. 2019;569(7754):126–30.
74. Schulz O, Jaensson E, Persson EK, Liu X, Worbs T, Agace WW, et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3101–14.
75. Zigmund E, Jung S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol*. 2013 Apr;34(4):162–8.
76. Shale M, Schiering C, Powrie F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol Rev*. 2013 Mar;252(1):164–82.
77. Luu M, Steinhoff U, Visekruna A. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clin Transl Immunol*. 2017 Sep;6(9):e156.
78. Bergqvist P, Gärdby E, Stensson A, Bemark M, Lycke NY. Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Dec 1;177(11):7772–83.
79. Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, et al. Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 16;101(11):3903–8.
80. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*. 2007 Mar;8(3):294–303.
81. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):145–9.
82. Bostick JW, Zhou L. Innate lymphoid cells in intestinal immunity and inflammation. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2016 Jan;73(2):237–52.



83. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1321–5.
84. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol*. 1999;276(4):G941-950.
85. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006 Aug 25;313(5790):1126–30.
86. Donia MS, Fischbach MA. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):1254766.
87. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):834–41.
88. Hugon P, Dufour J-C, Colson P, Fournier P-E, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1211–9.
89. Ferrara JLM, Smith CM, Sheets J, Reddy P, Serody JS. Altered homeostatic regulation of innate and adaptive immunity in lower gastrointestinal tract GVHD pathogenesis. *J Clin Invest*. 2017 Jun 5;127(7):2441–51.
90. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, et al. Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1867–71.
91. Bruce DW, Stefanski HE, Vincent BG, Dant TA, Reisdorf S, Bommasamy H, et al. Type 2 innate lymphoid cells treat and prevent acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2017 May 1;127(5):1813–25.
92. 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 Oct 15;90(8):3204–13.
93. Lamarthée B, Malard F, Saas P, Mohty M, Gaugler B. Interleukin-22 in Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2016;7:148.
94. Brennan TV, Lin L, Huang X, Cardona DM, Li Z, Dredge K, et al. Heparan sulfate, an endogenous TLR4 agonist, promotes acute GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2899–908.
95. Troeger H, Hering NA, Bojarski C, Fromm A, Barmeyer C, Uharek L, et al. Epithelial barrier dysfunction as permissive pathomechanism in human intestinal graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(8):1083–6.
96. Noth R, Lange-Grumfeld J, Stüber E, Kruse M-L, Ellrichmann M, Häslér R, 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 Oct 6;11:109.
97. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005 Jun;19(8):923–33.
98. Nalle SC, Zuo L, Ong MLDM, Singh G, Worthylake AM, Choi W, et al. Graft-versus-host disease propagation depends on increased intestinal epithelial tight junction permeability. *J Clin Invest*. 2019 Feb 1;129(2):902–14.

99. Beelen DW, Elmaagacli A, Müller KD, Hirche H, Schaefer UW. 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 May 15;93(10):3267–75.
100. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014 Aug 14;124(7):1174–82.
101. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood*. 2012 Jul 5;120(1):223–31.
102. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Noizat C, Ogasawara R, Takahashi S, et al. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2017 Dec 4;214(12):3507–18.
103. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, et al. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1373–83.
104. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigsknecht M, Hanash A, Toubai T, et al. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol*. 2016;17(5):505–13.
105. Swimm A, Giver CR, DeFilipp Z, Rangaraju S, Sharma A, Ulezko Antonova A, et al. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood*. 2018 06;132(23):2506–19.
106. Gonzales F, Bruno B, Alarcón Fuentes M, De Berranger E, Guimber D, Behal H, et al. Better early outcome with enteral rather than parenteral nutrition in children undergoing MAC allo-SCT. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2018;37(6 Pt A):2113–21.
107. Battipaglia G, Malard F, Rubio MT, Ruggeri A, Mamez AC, Brissot E, et al. Fecal microbiota transplantation before or after allogeneic hematopoietic transplantation in patients with hematologic malignancies carrying multidrug-resistance bacteria. *Haematologica*. 2019 Aug;104(8):1682–8.
108. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979 Feb;23(2):403–11.
109. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis*. 1988 May;157(5):1032–8.
110. Price KS, Nestel FP, Lapp WS. Progressive Accumulation of Bacterial Lipopolysaccharide In Vivo During Murine Acute Graft-Versus-Host Disease. *Scand J Immunol*. 1997 Mar;45(3):294–300.
111. Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, Bungard D, Brinson YS, Delmonte J, 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 Nov 15;102(10):1882–91.
112. Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol*. 1986 Jun;166(3):699–705.
113. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2013 Dec;16(6):779–85.

114. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002 Jul;4(8):837–51.
115. Steimle A, Autenrieth IB, Frick J-S. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2016 Aug;306(5):290–301.
116. Tanamoto K, Zähringer U, McKenzie GR, Galanos C, Rietschel ET, Lüderitz O, et al. Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infect Immun.* 1984 May;44(2):421–6.
117. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev.* 2006 May;30(3):382–403.
118. Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell.* 2016 May 5;165(4):842–53.
119. Munford RS, Varley AW. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.* 2006 Jun;2(6):e67.
120. Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, Callaghan M, Nurisso A, D’Errico G, et al. Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chem Weinh Bergstr Ger.* 2015 Jan 7;21(2):500–19.
121. Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. *Cell Microbiol.* 2009 Nov;11(11):1587–99.
122. Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 1968 Mar 31;19(1):186–97.
123. Pais de Barros J-P, Gautier T, Sali W, Adrie C, Choubley H, Charron E, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the *limulus* amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res.* 2015 Jul;56(7):1363–9.
124. Faraj TA, McLaughlin CL, Erridge C. Host defenses against metabolic endotoxaemia and their impact on lipopolysaccharide detection. *Int Rev Immunol.* 2017 04;36(3):125–44.
125. Liang-Takasaki CJ, Grossman N, Leive L. *Salmonellae* activate complement differentially via the alternative pathway depending on the structure of their lipopolysaccharide O-antigen. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1983 Apr;130(4):1867–70.
126. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.* 1995 May 5;270(18):10482–8.
127. Resman N, Vasl J, Oblak A, Pristovsek P, Gioannini TL, Weiss JP, et al. Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin. *J Biol Chem.* 2009 May 29;284(22):15052–60.
128. Ryu J-K, Kim SJ, Rah S-H, Kang JI, Jung HE, Lee D, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity.* 2017 17;46(1):38–50.
129. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1191–5.
130. Nijland R, Hofland T, van Strijp JAG. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. *Mar Drugs.* 2014 Jul 23;12(7):4260–73.

131. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*. 2008 Apr;9(4):361–8.
132. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*. 2004 May 28;117(5):561–74.
133. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 2013 Sep 13;341(6151):1246–9.
134. Rathinam VAK, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, et al. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*. 2012 Aug 3;150(3):606–19.
135. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol*. 2019;20(5):527–33.
136. Kopp F, Kupsch S, Schromm AB. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1863(4):660–72.
137. Henden AS, Hill GR. Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 May 15;194(10):4604–12.
138. 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 Feb 1;175(2):405–13.
139. Heremans H, Van Damme J, Dillen C, Dijkmans R, Billiau A. Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J Exp Med*. 1990 Jun 1;171(6):1853–69.
140. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1581–9.
141. Gartner JG, Durston MM, Booth SA, Ellison CA. Systemic Treatment with a miR-146a Mimic Suppresses Endotoxin Sensitivity and Partially Protects Mice from the Progression of Acute Graft-versus-Host Disease. *Scand J Immunol*. 2017 Nov;86(5):368–76.
142. Zhao Y, Liu Q, Yang L, He D, Wang L, Tian J, et al. TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Mol Immunol*. 2013 Mar;10(2):165–75.
143. Lu Y, Meng R, Wang X, Xu Y, Tang Y, Wu J, et al. Caspase-11 signaling enhances graft-versus-host disease. *Nat Commun*. 2019 Sep 6;10(1):4044.
144. Lim J-Y, Lee Y-K, Lee S-E, Ju J-M, Park G, Choi EY, et al. Attenuation of Hepatic Graft-versus-host Disease in Allogeneic Recipients of MyD88-deficient Donor Bone Marrow. *Immune Netw*. 2015 Jun;15(3):125–34.
145. Xing S, Zhang X, Huang X, Xie L, Jiang F, Zhou P. Modulating the conformation of the TIR domain by a neoteric MyD88 inhibitor leads to the separation of GVHD from GVT. *Leuk Lymphoma*. 2019 Jun;60(6):1528–39.
146. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2001;7(7):384–7.

147. Azzam KM, Fessler MB. Crosstalk between reverse cholesterol transport and innate immunity. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Apr;23(4):169–78.
148. Gautier T, Paul C, Deckert V, Desrumaux C, Klein A, Labbé J, et al. Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2010 Sep;24(9):3544–54.
149. Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inher Metab Dis*. 2003;26(2–3):267–87.
150. Christinat N, Masoodi M. Comprehensive Lipoprotein Characterization Using Lipidomics Analysis of Human Plasma. *J Proteome Res*. 2017 04;16(8):2947–53.
151. Thaxton CS, Rink JS, Naha PC, Cormode DP. Lipoproteins and lipoprotein mimetics for imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 15;106(Pt A):116–31.
152. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Jun;21(3):229–38.
153. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhainen M, et al. HDL biogenesis, remodeling, and catabolism. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:53–111.
154. Charles MA, Kane JP. New molecular insights into CETP structure and function: a review. *J Lipid Res*. 2012 Aug;53(8):1451–8.
155. Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, et al. Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999 May;13(8):883–92.
156. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*. 1996 May 24;271(21):12172–8.
157. Martinez LO, Jacquet S, Esteve J-P, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*. 2003 Jan 2;421(6918):75–9.
158. Murch O, Collin M, Hinds CJ, Thiernemann C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med*. 2007 Jan;33(1):13–24.
159. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2821–8.
160. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. *Biochem Soc Trans*. 2011 Aug;39(4):984–8.
161. Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol*. 2004 Feb;25(2):53–5.
162. Gazzano-Santoro H, Parent JB, Grinna L, Horwitz A, Parsons T, Theofan G, et al. High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1992 Nov;60(11):4754–61.
163. Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb;10(1):45–9.
164. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1025–35.

165. Yu B, Wright SD. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):4100–5.
166. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):485–93.
167. Gutschmann T, Müller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun.* 2001 Nov;69(11):6942–50.
168. Gautier T, Klein A, Deckert V, Desrumaux C, Ogier N, Sberna A-L, et al. Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice. *J Biol Chem.* 2008 Jul 4;283(27):18702–10.
169. Deckert V, Lemaire S, Ripoll P-J, de Barros J-PP, Labbé J, Borgne CC-L, et al. Recombinant human plasma phospholipid transfer protein (PLTP) to prevent bacterial growth and to treat sepsis. *Sci Rep.* 2017 08;7(1):3053.
170. Flegel WA, Wölpf A, Männel DN, Northoff H. Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):2237–45.
171. Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ, Warren HS. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1990 Jul;58(7):2375–82.
172. Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A, et al. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem.* 2002 Dec;269(23):5972–81.
173. Sprong T, Netea MG, van der Ley P, Verver-Jansen TJG, Jacobs LEH, Stalenhoef A, et al. Human lipoproteins have divergent neutralizing effects on *E. coli* LPS, *N. meningitidis* LPS, and complete Gram-negative bacteria. *J Lipid Res.* 2004 Apr;45(4):742–9.
174. Levels JHM, Lemaire LCJM, van den Ende AE, van Deventer SJH, van Lanschot JJB. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure. *Crit Care Med.* 2003 Jun;31(6):1647–53.
175. Mathison JC, Ulevitch RJ. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1979 Nov;123(5):2133–43.
176. Sewnath ME, Levels HH, Oude Elferink R, van Noorden CJ, ten Kate FJ, van Deventer SJ, et al. Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatology Baltim Md.* 2000 Dec;32(6):1289–99.
177. Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Kane JP, Rapp JH. The protective effect of serum lipoproteins against bacterial lipopolysaccharide. *Eur Heart J.* 1993 Dec;14 Suppl K:125–9.
178. Deng M, Scott MJ, Loughran P, Gibson G, Sodhi C, Watkins S, et al. Lipopolysaccharide clearance, bacterial clearance, and systemic inflammatory responses are regulated by cell type-specific functions of TLR4 during sepsis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2013 May 15;190(10):5152–60.
179. Guo L, Zheng Z, Ai J, Huang B, Li X-A. Hepatic scavenger receptor BI protects against polymicrobial-induced sepsis through promoting LPS clearance in mice. *J Biol Chem.* 2014 May 23;289(21):14666–73.

180. Yao Z, Mates JM, Cheplowitz AM, Hammer LP, Maiseyeu A, Phillips GS, et al. Blood-Borne Lipopolysaccharide Is Rapidly Eliminated by Liver Sinusoidal Endothelial Cells via High-Density Lipoprotein. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 15;197(6):2390–9.
181. Rudbach JA, Johnson AG. Alteration and restoration of endotoxin activity after complexing with plasma proteins. *J Bacteriol*. 1966 Oct;92(4):892–8.
182. Shao B, Lu M, Katz SC, Varley AW, Hardwick J, Rogers TE, et al. A host lipase detoxifies bacterial lipopolysaccharides in the liver and spleen. *J Biol Chem*. 2007 May 4;282(18):13726–35.
183. Satoh M, Ando S, Shinoda T, Yamazaki M. Clearance of bacterial lipopolysaccharides and lipid A by the liver and the role of argininosuccinate synthase. *Innate Immun*. 2008 Feb;14(1):51–60.
184. Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology*. 1995 Dec;109(6):1969–76.
185. Van Bossuyt H, De Zanger RB, Wisse E. Cellular and subcellular distribution of injected lipopolysaccharide in rat liver and its inactivation by bile salts. *J Hepatol*. 1988 Dec;7(3):325–37.
186. McDonald MC, Dhady P, Cockerill GW, Cuzzocrea S, Mota-Filipe H, Hinds CJ, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock Augusta Ga*. 2003 Dec;20(6):551–7.
187. Anderson BE, Taylor PA, McNiff JM, Jain D, Demetris AJ, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5242–51.
188. Blom KG, Qazi MR, Matos JBN, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol*. 2009 Feb;155(2):320–9.
189. Davis MR, Goldberg JB. Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction. *J Vis Exp JoVE*. 2012 May 28;(63).
190. van Leeuwen L, Guiffre A, Atkinson K, Rainer SP, Sewell WA. A two-phase pathogenesis of graft-versus-host disease in mice. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Jan;29(2):151–8.
191. Woting A, Blaut M. Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3H Mice. *Nutrients*. 2018 May 28;10(6).
192. Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 1996 May;64(5):1762–9.
193. Nijstad N, Gautier T, Briand F, Rader DJ, Tietge UJF. Biliary sterol secretion is required for functional in vivo reverse cholesterol transport in mice. *Gastroenterology*. 2011 Mar;140(3):1043–51.
194. Blazar BR, Carroll SF, Vallera DA. Prevention of murine graft-versus-host disease and bone marrow alloengraftment across the major histocompatibility barrier after donor graft preincubation with anti-LFA1 immunotoxin. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):3093–102.
195. Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, et al. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(6):907–14.
196. Williamson R, Lee D, Hagaman J, Maeda N. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):7134–8.

197. Kim SY, Jeong J-M, Kim SJ, Seo W, Kim M-H, Choi W-M, et al. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex. *Nat Commun*. 2017 21;8(1):2247.
198. Takayama K, Qureshi N, Raetz CR, Ribic E, Peterson J, Cantrell JL, et al. Influence of fine structure of lipid A on *Limulus* amoebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infect Immun*. 1984 Aug;45(2):350–5.
199. McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, et al. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2009 Mar 3;119(8):1135–45.
200. Malik P, Berisha SZ, Santore J, Agatista-Boyle C, Brubaker G, Smith JD. Zymosan-mediated inflammation impairs in vivo reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 2011 May;52(5):951–7.
201. Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, et al. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;29(2):261–7.
202. Ruutu T, Juvonen E, Remberger M, Remes K, Volin L, Mattsson J, et al. Improved survival with ursodeoxycholic acid prophylaxis in allogeneic stem cell transplantation: long-term follow-up of a randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2014 Jan;20(1):135–8.
203. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid “mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders.” *J Hepatol*. 2001 Jul;35(1):134–46.
204. Hatano R, Kawaguchi K, Togashi F, Sugata M, Masuda S, Asano S. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Intrahepatic Cholestasis Independent of Biliary Bicarbonate Secretion in *Vil2kd/kd* Mice. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(1):34–42.
205. Takigawa T, Miyazaki H, Kinoshita M, Kawarabayashi N, Nishiyama K, Hatsuse K, et al. Glucocorticoid receptor-dependent immunomodulatory effect of ursodeoxycholic acid on liver lymphocytes in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013 Sep 15;305(6):G427–438.
206. Schwarzenberg SJ, Bundy M. Ursodeoxycholic acid modifies gut-derived endotoxemia in neonatal rats. *Pediatr Res*. 1994 Feb;35(2):214–7.
207. El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017 Jul;13(7):e1006780.
208. Zhang Y, Shlomchik WD, Joe G, Louboutin J-P, Zhu J, Rivera A, et al. APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8<sup>+</sup> T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Dec 15;169(12):7111–8.
209. Holt MP, Cheng L, Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *J Leukoc Biol*. 2008 Dec;84(6):1410–21.
210. Sakai M, Troutman TD, Seidman JS, Ouyang Z, Spann NJ, Abe Y, et al. Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity*. 2019 Oct 15;51(4):655–670.e8.
211. Bonnardel J, T’Jonck W, Gaublomme D, Browaeys R, Scott CL, Martens L, et al. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity*. 2019 Oct 15;51(4):638–654.e9.
212. Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis*. 2006 Jan;184(1):1–7.
213. Kopecky C, Michlits G, Säemann MD, Weichhart T. Pro- versus Anti-inflammatory Actions of HDLs in Innate Immunity. *Cell Metab*. 2017 Jul 5;26(1):2–3.



214. van der Vorst EPC, Theodorou K, Biessen EAL, Donners MMPC. Disease- or Storage-Associated Structural Modifications Are Unlikely to Explain HDL Pro-inflammatory Effects on Macrophages. *Cell Metab.* 2017 Jul 5;26(1):4–5.
215. Galbois A, Thabut D, Tazi KA, Rudler M, Mohammadi MS, Bonnefont-Rousselot D, et al. Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology* Baltim Md. 2009 Jan;49(1):175–84.
216. Catapano AL, Pirillo A, Bonacina F, Norata GD. HDL in innate and adaptive immunity. *Cardiovasc Res.* 2014 Aug 1;103(3):372–83.
217. Ito A, Hong C, Oka K, Salazar JV, Diehl C, Witztum JL, et al. Cholesterol Accumulation in CD11c+ Immune Cells Is a Causal and Targetable Factor in Autoimmune Disease. *Immunity.* 2016 20;45(6):1311–26.
218. Westerterp M, Gautier EL, Ganda A, Molusky MM, Wang W, Fotakis P, et al. Cholesterol Accumulation in Dendritic Cells Links the Inflammasome to Acquired Immunity. *Cell Metab.* 2017 Jun 6;25(6):1294-1304.e6.
219. van der Vorst EPC, Theodorou K, Wu Y, Hoeksema MA, Goossens P, Bursill CA, et al. High-Density Lipoproteins Exert Pro-inflammatory Effects on Macrophages via Passive Cholesterol Depletion and PKC-NF- $\kappa$ B/STAT1-IRF1 Signaling. *Cell Metab.* 2017 10;25(1):197–207.
220. Rueda CM, Rodríguez-Perea AL, Moreno-Fernandez M, Jackson CM, Melchior JT, Davidson WS, et al. High density lipoproteins selectively promote the survival of human regulatory T cells. *J Lipid Res.* 2017;58(8):1514–23.
221. Fotakis P, Kothari V, Thomas DG, Westerterp M, Molusky MM, Altin E, et al. Anti-Inflammatory Effects of HDL (High-Density Lipoprotein) in Macrophages Predominate Over Proinflammatory Effects in Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Oct 3;ATVBAHA119313253.
222. Wang Y, Lu S, Zhang G, Wu S, Yan Y, Dong Q, et al. Anti-Inflammatory Effects of HDL in Mice With Rheumatoid Arthritis Induced by Collagen. *Front Immunol.* 2018;9:1013.
223. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med.* 2012 May 7;209(5):903–11.
224. Szponar B, Norin E, Midtvedt T, Larsson L. Limitations in the use of 3-hydroxy fatty acid analysis to determine endotoxin in mammalian samples. *J Microbiol Methods.* 2002 Aug;50(3):283–9.
225. Jones PM, Quinn R, Fennessey PV, Tjoa S, Goodman SI, Fiore S, et al. Improved stable isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry method for serum or plasma free 3-hydroxy-fatty acids and its utility for the study of disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Clin Chem.* 2000 Feb;46(2):149–55.
226. Weinstock C, Ullrich H, Hohe R, Berg A, Baumstark MW, Frey I, et al. Low density lipoproteins inhibit endotoxin activation of monocytes. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol.* 1992 Mar;12(3):341–7.
227. Schwartz YS, Polyakov LM, Dushkin MI, Pivovarova EN. Modification and clearance of low density lipoproteins during the formation of endotoxin-lipoprotein complexes. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Apr;145(4):430–2.
228. Grass DS, Saini U, Felkner RH, Wallace RE, Lago WJ, Young SG, et al. Transgenic mice expressing both human apolipoprotein B and human CETP have a lipoprotein cholesterol distribution similar to that of normolipidemic humans. *J Lipid Res.* 1995 May;36(5):1082–91.

229. van der Tuin SJL, Li Z, Berbée JFP, Verkouter I, Ringnalda LE, Neele AE, et al. Lipopolysaccharide Lowers Cholesteryl Ester Transfer Protein by Activating F4/80+Clec4f+Vsig4+Ly6C- Kupffer Cell Subsets. *J Am Heart Assoc.* 2018 10;7(6).
230. Venancio TM, Machado RM, Castoldi A, Amano MT, Nunes VS, Quintao ECR, et al. CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:1784014.
231. Darabi M, Guillas-Baudouin I, Le Goff W, Chapman MJ, Kontush A. Therapeutic applications of reconstituted HDL: When structure meets function. *Pharmacol Ther.* 2016 Jan;157:28–42.
232. Berthou L, Duverger N, Emmanuel F, Langouët S, Auwerx J, Guillouzo A, et al. Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2408–16.
233. Singh JP, Kauffman R, Bensch W, Wang G, McClelland P, Bean J, et al. Identification of a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, 2-methyl-2-(4-{3-[1-(4-methylbenzyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-3-yl]propyl}phenoxy)propanoic acid (LY518674), that produces marked changes in serum lipids and apolipoprotein A-1 expression. *Mol Pharmacol.* 2005 Sep;68(3):763–8.
234. Bailey D, Jahagirdar R, Gordon A, Hafiane A, Campbell S, Chatur S, et al. RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jun 8;55(23):2580–9.
235. Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam M-HN, Burton CA, Chin J, et al. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol.* 2006 Feb 14;71(4):453–63.
236. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2011 Jul;121(7):2921–31.
237. Rousset X, Vaisman B, Auerbach B, Krause BR, Homan R, Stonik J, et al. Effect of recombinant human lecithin cholesterol acyltransferase infusion on lipoprotein metabolism in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):140–8.
238. Amar MJA, D'Souza W, Turner S, Demosky S, Sviridov D, Stonik J, et al. 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Aug;334(2):634–41.
239. Remaley AT, Norata GD, Catapano AL. Novel concepts in HDL pharmacology. *Cardiovasc Res.* 2014 Aug 1;103(3):423–8.
240. Tall AR. Plasma high density lipoproteins: Therapeutic targeting and links to atherogenic inflammation. *Atherosclerosis.* 2018;276:39–43.
241. Zhang L-H, Kamanna VS, Zhang MC, Kashyap ML. Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *J Lipid Res.* 2008 Jun;49(6):1195–201.
242. Masson D, Koseki M, Ishibashi M, Larson CJ, Miller SG, King BD, et al. Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2054–60.
243. Couturier M, Lamarthée B, Arbez J, Renauld J-C, Bossard C, Malard F, 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 Jul;27(7):1527–37.

244. Ceroi A, Masson D, Roggy A, Roumier C, Chagué C, Gauthier T, et al. LXR agonist treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm restores cholesterol efflux and triggers apoptosis. *Blood*. 2016 08;128(23):2694–707.
245. Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, et al. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):339–50.
246. Xu H, Wang X, Lackner AA, Veazey RS. Type 3 innate lymphoid cell depletion is mediated by TLRs in lymphoid tissues of simian immunodeficiency virus-infected macaques. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015 Dec;29(12):5072–80.

# Annexes

# Annexe 1 – Demande de brevet



**BREVET D'INVENTION**  
*Code de la propriété intellectuelle - Livre VI*  
**REQUETE EN DELIVRANCE**

**Numéro d'enregistrement** : FR1910075  
**Lieu de dépôt** : 92 INPI - Dépôt électronique  
**Date de la demande** : 12/09/2019  
**Référence client** : BFF 19P0623/LF  
**Type de brevet** : Brevet français

## Rubrique 1 : NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**Société/Cabinet** : Lavoix  
**Nom/Prénom** : Monsieur COLOMBIE Damien  
**Adresse** :  
2, place d'Estienne d'Orves  
75441 PARIS CEDEX 09  
France

## Rubrique 2 : TITRE DE L'INVENTION

**Titre** : Utilisation de HDL dans la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte

## Rubrique 3 : PRIORITÉS

Néant

## Rubrique 4 - 1 : DEMANDEUR (Personne Morale)

**Dénomination sociale** : Etablissement Français du Sang  
**Forme juridique** : Etablissement Public Industriel et Commercial  
**N°SIREN** :  
428822852  
**Adresse** :  
20, avenue du Stade de France  
93210 LA PLAINE SAINT DENIS  
France

**Rubrique 5 : MANDATAIRE****Société/Cabinet :** Lavoix**Nom/Prénom :** Monsieur COLOMBIE Damien**Qualité :** CPI brevets**N°CPI :** 06-0306**Adresse :**2, place d'Estienne d'Orves  
75441 PARIS CEDEX 09  
France**Rubrique 6 : RENVOI À UNE DEMANDE ANTÉRIEURE****Renvoi à une demande de brevet déjà déposée :** Non**Rubrique 7 : RAPPORT DE RECHERCHE EQUIVALENT****Rapport de recherche équivalent :** Non**Rubrique 8 : RÉDUCTION DES REDEVANCES****Bénéficiaire de la réduction des redevances :** Non**Rubrique 9 : DÉPÔT DE MATIÈRE BIOLOGIQUE**

Néant

**Rubrique 10 : SÉQUENCES DE NUCLÉOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS****La demande contient une liste de séquences :** Non**Rubrique 11 : DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS**

N°	Type de document	Fichier électronique	Détails
1	Contenu de la demande DOCX	HDLLPSGvHD_BFF19P0623_Demande de brevet déposée.docx	
2	Contenu de la demande PDF	HDLLPSGvHD_BFF19P0623_Demande de brevet déposée.docx.pdf	
3	Contenu de la demande ZIP	HDLLPSGvHD_BFF19P0623_Demande de brevet déposée.docx.zip	
4	Contenu de la demande XML	application-body.xml	

**Rubrique 12 : DEMANDE DE DELIVRANCE ACCELEREE****Demande de délivrance accélérée :** Non**Rubrique 13 : EXTENSION DE LA PROTECTION****Extension de la protection à la Polynésie Française :** Non

**Rubrique 14 : PAIEMENT DES REDEVANCES**

**Mode de paiement :** Compte Client

Prestation	Tarif	Quantité	Total
Dépôt d'une demande de brevet / certificat d'utilité sous forme électronique	26	1	26
Rapport de recherche	520	1	520
<b>Total (EURO) :</b>			546

**Rubrique 15 : DATE ET SIGNATURE**

**Nom/Prénom :** Monsieur COLOMBIE Damien

**Qualité :** CPI

**N°CPI :** 06-0306

**Date de signature :** 12/09/2019

Ce document récapitule les données du dépôt déclarées conformes par le signataire.





**Requête en délivrance**  
*Code de la propriété intellectuelle - Livre VI*  
**DESIGNATION D'INVENTEUR(S)**

15 rue des Minimes - CS 50001 - 92677 Courbevoie Cedex  
INPI Direct : 0820 210 211 (Service 0.10€/min + prix appel)  
Pour déposer par télécopie : 33(0)1 56 65 86 00

**Vos références pour ce dossier :** BFF 19P0623/LF  
**n° dépôt :** FR1910075

**LE(S) DEMANDEUR(S)**

**Rubrique - 1 : LE DEMANDEUR (Personne Morale)**

**Dénomination sociale :** Etablissement Français du Sang  
**Forme juridique :** Etablissement Public Industriel et Commercial  
**N°SIREN :**  
428822852  
**Adresse :**  
20, avenue du Stade de France  
93210 LA PLAINE SAINT DENIS  
France

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)**



**Rubrique - 1 : INVENTEUR**

**Nom/Prénom :** Madame CHAGUÉ Cécile

**Adresse :**

2 rue François-Xavier Bichat  
25000 BESANCON  
France

**Rubrique - 2 : INVENTEUR**

**Nom/Prénom :** Monsieur DAGUINDAU Etienne

**Adresse :**

22 rue Les Hauts de Vorin  
25770 SERRE LES SAPINS  
France

**Rubrique - 3 : INVENTEUR**

**Nom/Prénom :** Monsieur SAAS Philippe

**Adresse :**

45 rue des granges  
25000 BESANCON  
France

**Rubrique : DATE ET SIGNATURE**

**Nom/Prénom :** Monsieur COLOMBIE Damien

**Qualité :** CPI

**N°CPI :** 06-0306

**Date de signature :** 12/09/2019

**DESCRIPTION**

**TITRE : Utilisation de HDL dans la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte**

5

La présente invention concerne la prévention et/ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte.

10

L'efficacité curative de la transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques (BMT) est considérablement diminuée par la maladie du greffe contre l'hôte (GvHD) qui entraîne une mortalité et une morbidité significative.

15

La GvHD représente une pathologie pour laquelle la corticothérapie reste à ce jour la première ligne de traitement. Toutefois, d'une part la corticothérapie est associée à de nombreuses complications iatrogènes (diabète, perturbations du métabolisme osseux avec risque de nécroses osseuses aseptiques, hypertension artérielle, dyslipidémie, etc.), et d'autre part, le pronostic est sombre en cas de résistance à ce traitement. Il n'existe pas de consensus de traitement dans ces situations graves et les outils disponibles restent des approches d'immunosuppression interférant avec le cycle cellulaire des lymphocytes T.

20

Il existe donc un besoin important de traitements alternatifs de la GvHD évitant de tels effets secondaires.

La présente invention vise à répondre à ce besoin.

25

Les sous-groupes de lymphocytes T du donneur sont reconnus comme étant les médiateurs et effecteurs cellulaires principaux de la GvHD aiguë. Des interactions des lymphocytes T avec les cellules présentatrices d'antigènes (APC) originaires de l'hôte et du donneur sont nécessaires pour atteindre le statut de « lymphocyte T activé alloréactif » générant l'attaque cytotoxique contre les organes cibles. Cependant, le réveil préliminaire des APC par des signaux d'alarme exogènes ou endogènes provenant de cellules blessées ou « en détresse » est critique pour recruter et mener une activation des lymphocytes T efficace. Les signaux exogènes sont un groupe de profils microbiens naturels très répandus appelés « profils moléculaires associés au pathogène » (PAMP) et il est supposé qu'ils sont transloqués à partir du microbiote en cas de faiblesse des barrières naturelles du corps, en particulier la muqueuse intestinale. Parmi ces PAMP, le lipopolysaccharide (LPS) est le plus fortement étudié dans la pathophysiologie de la GvHD.

35

2

La présente invention résulte de la découverte inattendue par les inventeurs que l'administration répétée de lipoprotéines HDL neutralise les LPS dans le contexte de la GvHD, réduisant la maturation des cellules présentatrices d'antigènes et diminuant l'activation de cellules effectrices de la GvHD, les lymphocytes T Tc1, et diminuant la survenue et la gravité de la GvHD aiguë.

Ainsi, pour la première fois, le traitement proposé ici par les inventeurs, l'administration de HDL, permet de prévenir et traiter la GvHD, sans reposer sur un traitement immunosuppresseur toxique, mais sur une modulation du métabolisme lipidique sans impact sur la qualité de la reconstitution immunitaire post-greffe et avec une toxicité minimale attendue sur les autres organes.

Cooke *et al.* (2001) *J. Clin. Invest.* **107**:1581 ont étudié l'utilisation d'un inhibiteur compétitif du LPS, le composé B975, dans un modèle murin de transplantation de moelle osseuse. Contrairement au composé B975, HDL n'est pas un inhibiteur compétitif du LPS mais le neutralise et l'élimine.

De plus, les HDL présentent en outre un effet anti-inflammatoire, indépendant du LPS, renforçant encore leur intérêt pour prévenir et/ou traiter la GvHD, une pathologie avec une forte composante inflammatoire.

La présente invention concerne ainsi une lipoprotéine de haute densité (HDL), un mimétique de HDL ou un activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, chez un sujet.

### **Description détaillée de l'invention**

#### *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL*

Par « lipoprotéine de haute densité » ou « HDL », on entend ici le groupe de particules de lipoprotéines le plus petit et le plus dense.

Les HDL sont bien connues de l'homme du métier et sont typiquement des lipoprotéines riches en cholestérol, phospholipides et comprenant les apolipoprotéines A1, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, et E, de densité comprise entre 1,063 et 1,210 et de diamètre variant entre 5 et 12 nm.

Typiquement, les HDL utilisées dans le cadre de l'invention sont isolées de sang de donneur sain, en particulier à partir de plasma de donneur sain, par exemple par des techniques de séparation par ultracentrifugation.

Alternativement, les HDL utilisées dans le cadre de l'invention sont reconstituées à partir d'apolipoprotéine A1 purifiée ou recombinante, telle que définie ci-dessous, et de lipides sélectionnés, en particulier de phospholipides de soja.

3

Ainsi, des exemples de HDL pouvant être utilisés dans le cadre de l'invention incluent le CSL111 tel que décrit dans Tardif *et al.* (2007) *JAMA* **297** :1675-1682, le CSL112 tel que décrit dans Diditechenko *et al.* (2013) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33** :2202-211, le CER-001 tel que décrit dans Tardif *et al.* (2014) *Eur. Heart J.* **35** :3277-3286, l'ETC-216 (aussi appelé MDCO-216, une HDL reconstituée à partir de l'ApoA1<sup>Milano</sup>.

Par « activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL », on entend ici un composé induisant, directement ou indirectement, ou potentialisant la formation et/ou la maturation de HDL. Les activateurs de la formation et/ou de la maturation de HDL au sens de l'invention incluent également les inhibiteurs du transfert des esters de cholestérol.

Des exemples d'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL incluent la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), l'apolipoprotéine A1, les mimétiques de l'apolipoprotéine A1, les inducteurs de l'apolipoprotéine A1 et les inhibiteurs de CETP.

Dans un mode de réalisation particulier, l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL utilisé dans le cadre de l'invention est l'apolipoprotéine A1.

Par « apolipoprotéine A1 », on entend ici l'apolipoprotéine codée par le gène *APOA1*. L'apolipoprotéine A1 utilisée dans le cadre de l'invention peut être une apolipoprotéine A1 sauvage ou l'apolipoprotéine A1 mutante ApoA1<sup>Milano</sup>.

Des exemples de mimétique de l'apolipoprotéine A1 incluent les peptides 18A et 2F tels que décrits dans Mendez *et al.* (1994) *J. Clin. Invest.* **94** :1698-1705, le peptide 4F tel que décrit dans Datta *et al.* (2001) *J. Lipid. Res.* **42** :1096-1104, le peptide APL180 (aussi appelé L-4F) tel que décrit dans Navab *et al.* (2010) *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30** :164-168, le peptide ETC-642 tel que décrit dans Di Bartolo *et al.* (2011) *Atherosclerosis* **217** :395-400, le peptide 37pA tel que décrit dans Mishra *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270** :1602-1611, le peptide 5A tel que décrit dans Sethi *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* **283** :32273-32282, le peptide D-4F tel que décrit dans Naval *et al.* (2009) *J. Lipid. Res.* **50** :1538-1547, le peptide 5A-CH tel que décrit dans D'Souza *et al.* (2010) *Circ. Res.* **107** :217-227, le peptide FAMP5 tel que décrit dans Uehara *et al.* (2013) *J. Am. Heart Assoc.* **2** :e000048, les peptides S1A10 et S2A10 tels que décrits dans Sviridov *et al.* (2011) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **410** :446-421, le peptide 6F tel que décrit dans Chattopadhyay *et al.* (2013) *J. Lipid. Res.* **54** :995-1010, le peptide ATI-5261 tel que décrit dans Bielicki *et al.* (2010) *J. Lipid. Res.* **51** :1496-1503 et la molécule TripA-I telle que décrite dans Graversen *et al.* (2008) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **51** :170-177.

Les inducteurs de l'apolipoprotéine A1 pouvant être utilisés dans le cadre de l'invention sont bien connus de l'homme du métier et incluent les fibrates, tels que le

bézafibrate, le ciprofibrate, le fénofibrate et le gemfibrozil ; et l'apabetalone (aussi appelée RVX-208).

Les inhibiteurs de CETP pouvant être utilisés dans le cadre de l'invention sont bien connus de l'homme du métier et incluent le torcetrapib, l'anacetrapib, le dalcetrapib et l'evacetrapib.

Dans un mode de réalisation particulier, l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL utilisé dans le cadre de l'invention n'est pas un inhibiteur compétitif des lipopolysaccharides bactériens (LPS).

Par « mimétique de HDL », on entend ici des molécules mimant la fonction du HDL.

Des exemples de mimétique de HDL incluent des nanoparticules d'or recouvertes de phospholipides et d'ApoA1 ou de mimétiques d'ApoA1, et des HDL reconstituées à partir de mimétiques d'ApoA1 telles que la molécule ETC-642 décrite dans Di Bartolo *et al.* (2011) *Lipids Health* **10** :224.

#### *Applications médicales*

La présente invention concerne une lipoprotéine de haute densité (HDL) telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, un mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou un activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, chez un sujet.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une lipoprotéine de haute densité (HDL) telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, d'un mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou d'un activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, chez un sujet.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de prévention et/ou de traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une lipoprotéine de haute densité (HDL) telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, d'un mimétique de

5

HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou d'un activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, chez un sujet qui en a besoin.

5

Par « traitement » ou « traiter », on entend ici atteindre, partiellement ou substantiellement, un ou plusieurs des résultats suivants : réduire partiellement ou totalement l'étendue de la maladie, améliorer un symptôme clinique ou un indicateur associé à la maladie, retarder, inhiber ou prévenir la progression de la maladie, ou  
10 partiellement ou totalement retarder, inhiber ou prévenir la survenue d'une rechute de la maladie.

Dans le cadre de l'invention, le terme « prévention » ou « prévenir » se réfère à n'importe quel indice de succès pour protéger un sujet ou d'un patient (par exemple un sujet ou un patient à risque de développer une maladie) du développement, du fait de  
15 contracter ou d'avoir une maladie, y compris la prévention d'un ou plusieurs symptômes de la maladie.

Par « sujet », on entend ici un mammifère, de préférence un humain. De préférence, le sujet traité dans le cadre de l'invention souffre d'un cancer, en particulier une hémopathie maligne (telle qu'une leucémie, un lymphome ou un myélome), ou d'un  
20 trouble hématologique non-malin tel qu'un déficit immunitaire primitif, une aplasie médullaire ou une myélodysplasie.

Par « maladie du greffon contre l'hôte » ou « GvHD » ou « GvH » ou « réaction du greffon contre l'hôte », on entend ici toute réponse immunitaire à médiation par les lymphocytes T dans laquelle les lymphocytes du donneur réagissent vis-à-vis des  
25 antigènes de l'hôte, typiquement après une greffe de moelle osseuse ou allogreffe de cellules hématopoïétiques.

La GvHD est définie par son caractère « aigu » ou « chronique » selon son délai de survenue et surtout le type de manifestations cliniques qui regroupent respectivement une sémiologie inflammatoire ou fibrosante. Une forme appelée « *overlap syndrom* »  
30 caractérise une GvHD qui regroupe des caractéristiques de GvHD aiguë et chronique. La sévérité de la GvHD aiguë peut varier de légère à très grave. De façon usuelle, la sévérité de la GvHD chronique se définit quant à elle par son caractère « limité ou extensif ».

La GvHD aiguë apparaît le plus souvent au cours des 100 premiers jours qui suivent l'allogreffe. Elle affecte souvent la peau, le foie et l'intestin, mais elle peut aussi  
35 toucher d'autres organes. La GvHD aiguë peut être classée selon la gravité des symptômes :

6

- grade 1 : symptômes légers,
- grade 2 : symptômes modérés,
- grade 3 : symptômes graves,
- grade 4 : symptômes très graves.

5 Les symptômes de la GvHD aiguë incluent typiquement les symptômes suivants : sensation de brûlure et rougeur de la peau de la paume des mains ou de la plante des pieds, éruptions cutanées qui peuvent se propager au corps entier, ampoules et desquamation, anorexie, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée associée à une malabsorption, cytolysé hépatique associée à un ictère, les anomalies hépatiques pouvant aller jusqu'à une insuffisance hépatocellulaire.

10 La GvHD chronique apparaît classiquement à partir du 3<sup>ème</sup> mois après l'allogreffe. Elle peut durer quelques mois ou toute la vie. La GvHD chronique peut se produire juste après une GvHD aiguë ou une période sans symptômes. Les symptômes de la GvHD chronique incluent typiquement les symptômes suivants : troubles de la peau comme la sécheresse, les éruptions cutanées, les démangeaisons, la desquamation, poikilodermie, perte des propriétés élastiques de la peau aboutissant à un tableau de sclérodermie plus ou moins étendu. Un syndrome sec muqueux et/ou ophtalmique est souvent présent traduit par une sensation de brûlure/corps étranger dans les yeux, xérostomie (sécheresse buccale) accompagnée ou non de lichen ou ulcères buccaux. Sur le plan digestif, la GvHD chronique se manifeste par une anorexie, douleurs abdominales, diarrhée, nausées/vomissements. De nombreux autres organes peuvent être atteints comme les poumons (fibrose pulmonaire) ou le système musculo-squelettique (polyarthrites, crampes). Il est à noter que la GvHD chronique extensive est fréquemment associée à un défaut de reconstitution immunitaire exposant le patient à des complications infectieuses opportunistes.

25 Dans un mode de réalisation particulier, la GvHD prévenue ou traitée dans le cadre de l'invention est la GvHD aiguë.

Comme indiqué ci-dessus, une GvHD se produit typiquement après une greffe de cellules hématopoïétiques.

30 Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, pour prévenir ou traiter la GvHD, en particulier la GvHD aiguë, le sujet à traiter a subi ou va subir une greffe, en particulier une allogreffe, de cellules hématopoïétiques.

35 Plus particulièrement, dans un mode de réalisation particulier visant à prévenir la GvHD, le sujet à traiter va subir une greffe, en particulier une allogreffe, de cellules hématopoïétiques.

Dans un mode de réalisation alternatif visant à traiter la GvHD, le sujet à traiter a subi une greffe, en particulier une allogreffe, de cellules hématopoïétiques.

Par « syndrome de relargage des cytokines » ou « CRS », on entend ici une  
5 réponse inflammatoire systématique qui peut être déclenchée par différents facteurs tels que des infections et certains médicaments. Le CRS est ainsi typiquement observé comme effet secondaire après l'administration de thérapies à base d'anticorps, d'anticancéreux non-protéiques, après l'administration de lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T), mais aussi après une greffe de moelle osseuse ou une  
10 GvHD. Ce syndrome se caractérise typiquement par une dyspnée sévère, avec bronchospasme et hypoxie, associée à de la fièvre, des frissons, des tremblements, de l'urticaire et des angio-oedèmes, et peut conduire à une insuffisance respiratoire aiguë et au décès.

Ainsi, dans un mode de réalisation particulier visant la prévention et/ou le  
15 traitement du CRS, le sujet à traiter a été traité ou est traité avec des agents anticancéreux, en particulier des anticorps anticancéreux, ou avec des cellules CAR-T, ou a subi ou va subir une greffe de cellules hématopoïétiques.

Dans un mode de réalisation préféré visant à prévenir et/ou traiter le syndrome de  
20 relargage des cytokines, le sujet à traiter est traité ou a été traité avec des lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T).

La lipoprotéine de haute densité (HDL) telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus est typiquement administré au sujet qui en a besoin dans  
25 une quantité thérapeutiquement efficace.

Par « quantité thérapeutiquement efficace », on entend ici une quantité de principe  
30 actif suffisante pour détruire, modifier, contrôler ou éliminer la maladie. Une « quantité thérapeutiquement efficace » désigne aussi une quantité de principe actif permettant de retarder ou minimiser l'étendue de la maladie. Elle se réfère également à la quantité de principe actif fournissant un bénéfice thérapeutique dans le traitement ou la prise en charge de la maladie. Enfin, l'expression « quantité thérapeutiquement efficace » signifie  
35 une quantité de principe actif, seul, ou en combinaison avec d'autres thérapies, qui fournit



8

un bénéfice thérapeutique dans le traitement ou la prise en charge de la maladie, incluant une amélioration des symptômes associés à la maladie.

La quantité thérapeutiquement efficace dépend naturellement de l'actif considéré, du mode d'administration, de l'indication thérapeutique, de l'âge du patient et de son état.

5 Avantageusement, le composé actif utilisé dans le cadre de l'invention se trouve sous la forme d'une composition pharmaceutique éventuellement comprenant en outre un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10 Par "pharmaceutiquement acceptable", on entend ici des compositions et entités moléculaires qui ne produisent pas de réactions secondaires, allergiques ou autrement non-désirées quand elles sont administrées à un sujet. Un excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable est ainsi une matière encapsulante, un diluant, un support, ou tout autre auxiliaire de formulation liquide, semi-solide ou solide non-toxique.

15 Les compositions pharmaceutiques utilisées dans le cadre de l'invention sont typiquement préparées afin de s'adapter au mode d'administration. Les excipients pharmaceutiques acceptables sont typiquement déterminés en partie par la composition administrée, ainsi que par la technique particulière utilisée pour administrer la composition.

20 Le dosage des composés à administrer dépend du cas individuel et, comme il est bien connu de l'homme du métier, doit être adapté aux circonstances individuelles pour obtenir une quantité thérapeutique efficace et un effet optimum. Le niveau de dose thérapeutiquement efficace est spécifique pour tout patient, et dépendra en particulier d'une variété de facteurs, y compris le trouble qui est traité et la sévérité du trouble, l'activité du composé spécifique utilisé; la composition spécifique employée, l'âge, le poids corporel, la santé générale, le sexe et le régime alimentaire du patient, le  
25 temps d'administration, la voie d'administration, et le taux d'excrétion du composé spécifique utilisé, la durée du traitement, les médicaments utilisés en combinaison avec le composé spécifique employé, et des facteurs analogues bien connus du domaine médical. Par exemple, il est bien connu pour l'homme de l'art de commencer à des doses du composé à des niveaux inférieurs à ceux requis pour atteindre l'effet thérapeutique  
30 souhaité et d'augmenter progressivement la posologie jusqu'à ce que l'effet souhaité soit obtenu.

La dose quotidienne peut être administrée en une seule dose ou, en particulier lorsque de plus grandes quantités sont administrées, être divisée en plusieurs doses individuelles.

35 Le dosage de la substance active dépend particulièrement du mode d'administration, et est aisément déterminé par l'homme de métier. Une quantité

thérapeutiquement (dose unitaire) efficace de composé peut varier de 0,01 mg/kg à 500 mg/kg, préférablement de 0,1 mg/kg à 500 mg/kg, préférablement de 0,1 mg/kg à 250 mg/kg, préférablement de 0,1 mg/kg à 100 mg/kg, préférablement de 0,1 mg/kg à 50 mg/kg, et plus préférablement de 1 mg/kg à 20 mg/kg, en une ou plusieurs administrations hebdomadaire, pendant plusieurs semaines ou mois. La dose unitaire efficace peut donc aisément être déduite d'une dose calculée pour un patient « moyen » dont le poids est de 70 kg.

Typiquement, la lipoprotéine de haute densité (HDL) telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus est administré à une dose de 20 mg/kg.

Dans un mode de réalisation particulier, la HDL telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la synthèse de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus est administré de manière répétée, de préférence tous les deux jours.

Dans un mode de réalisation particulier, lorsque le sujet à traiter va subir une greffe de cellules hématopoïétiques, la HDL telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus est administré avant la greffe de cellules hématopoïétiques, de préférence pendant la phase de conditionnement, typiquement 7 jours avant la greffe de cellules hématopoïétiques.

De préférence, la HDL telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus est administré avant la greffe de cellules hématopoïétiques, comme défini ci-dessus, et est de nouveau administré après la greffe de cellules hématopoïétiques, typiquement 1 à 3 jours après la greffe de cellules hématopoïétiques, en particulier 1 jour après la greffe de

10

cellules hématopoïétiques, plus particulièrement de manière répétée entre 1 et 24 jours après la greffe de cellules hématopoïétiques.

Alternativement, la HDL telle que définie dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, le mimétique de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL tel que défini dans la section « *HDL et activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL* » ci-dessus commence à être administré après la greffe de cellules hématopoïétiques, typiquement 1 à 7 jours après la greffe de cellules hématopoïétiques, typiquement 1 jour après la greffe de cellules hématopoïétiques, plus particulièrement de manière répétée entre 1 et 24 jours après la greffe de cellules hématopoïétiques.

Les compositions utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être sous forme solide, liquide ou semi-solide, adaptée aux diverses voies d'administration (orale, rectale, nasale, intra oculaire, locale (par exemple, topique, transdermique, buccale, vaginale ou sublinguale) ou parentérale (par exemple sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou intradermique)).

De préférence, la HDL, le mimétique de HDL ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL est administré par voie intraveineuse.

Les formulations intraveineuses contiennent la substance active dissoute, en suspension ou émulsionnée dans un véhicule stérile, éventuellement en présence d'agents émulsifiants, des stabilisants, des agents tampons et d'autres additifs classiques ; elles sont normalement réparties dans des fioles ou des flacons pour perfusion, et peuvent être stockées sous forme de produits secs à reconstituer avec de l'eau ou avec un véhicule approprié avant utilisation.

Les compositions pharmaceutiques solides peuvent être des comprimés, des gélules, des poudres, des granules, des pilules, des poudres à reconstituer etc... ; elles peuvent contenir des excipients classiques tels que des liants, des charges, des diluants, des agents de compression, des lubrifiants, des détergents, des colorants, des agents aromatisants et des agents mouillants. Les comprimés peuvent être enrobés conformément à des procédés bien connus dans le domaine technique. Des charges appropriées incluent la cellulose, le mannitol, le lactose et d'autres agents similaires.

Les compositions liquides pour administration orale peuvent être sous forme de suspensions aqueuses ou huileuses, de solutions, d'émulsions, de sirops ou d'élixirs ou peuvent être présentées sous forme de produits secs pour reconstitution avec de l'eau ou un véhicule approprié avant utilisation; Elles peuvent contenir des additifs classiques, par

11

exemple des agents de suspension tels que le sorbitol, le sirop, la méthylcellulose, la gélatine, l'hydroxyéthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, un gel de stéarate d'aluminium ou des matières grasses comestibles hydrogénées, des émulsifiants tels que la lécithine, le monooléate de sorbitane ou la gomme arabique; des transporteurs non aqueux (qui peuvent comprendre des huiles comestibles) tels que l'huile d'amande, l'huile de noix de coco fractionnée, des esters huileux comme des esters de glycérine, de propylène glycol ou d'alcool éthylique; des conservateurs tels que méthyle ou de propyle p-hydroxybenzoate ou l'acide sorbique et, si cela est désiré, des agents aromatisants ou colorants classiques.

10

Dans le cadre de la présente demande, le terme « comprenant » doit être interprété comme couvrant toutes les caractéristiques spécifiquement mentionnées, ainsi qu'éventuellement certaines non-spécifiées additionnelles. Par ailleurs, l'utilisation du terme « comprenant » décrit également le monde de réalisation dans lequel aucune caractéristique autre que celles spécifiques mentionnées n'est présente (*i.e.* « consistant en »).

15

La présente invention sera décrite plus en détail par les figures et exemples ci-dessous.

20

### **Exemples**

25

#### **Exemple 1**

Dans cet exemple, les inventeurs montrent que la perfusion de lymphocytes T allogéniques induit une translocation précoce du LPS ainsi qu'une neutralisation plus faible des propriétés inflammatoires du LPS.

30

Dans un modèle murin établi de GvHD, qui consiste en des receveuses BALB/c irradiées de manière létale (8,5 Gy) et greffées avec  $5 \times 10^6$  moelle osseuse déplétées en lymphocytes T et  $1 \times 10^6$  lymphocytes T spléniques de donneuses BALB/c (syngéniques, syng) ou C57Bl/6 (allogéniques, allo), l'acide 3-hydroxymyristique (3HM) – l'acide gras hydroxylé le plus commun trouvé dans le lipide A LPS – a été quantifié dans le plasma et la bile des souris receveuses 3 et 6 jours après la transplantation de moelle osseuse

35

12

(BMT) en utilisant la chromatographie Endoquant® couplée avec la technologie de spectrométrie de masse (Plasma : n=26-32 souris/groupe de 6 expériences indépendantes, post-test de Kruskal-Wallis et de Dunn, \* : p = 0.0234, \*\* : p = 0.003, \*\*\*\* : p < 0.0001 : Bile : n=10-21 souris/groupe de 3 expériences indépendantes, post-test d'ANOVA unidirectionnelle et de Bonferroni, \* : p=0.0135, \*\* : p=0.0029, \*\*\*\* : p<0.0001) ([Figure 1]).

Les inventeurs ont observé que la forme soluble de CD14 (sCD14) était augmentée dans le plasma de souris allo-receveuses à j+15 après la transplantation (n=6-15 souris/groupe d'une expérience, post-test de Kruskal-Wallis et de Dunn, p=0.003 *versus* naïve et p=0.0054 *versus* syng) ([Figure 2]).

Les propriétés pro-inflammatoires restantes du LPS ont été estimées dans le plasma des souris receveuses. Brièvement, des cellules reportrices HEK-Blue TLR/CD14/MD-2 ont été cultivées en présence de 0.5% de plasma et 0.01 EU/ml de LPS standard. Les inventeurs ont montré qu'à j+3 après la transplantation, le plasma des souris allo-receveuses présentait une activité neutralisante de LPS commercial additionné à une concentration connue (0,01 EU/mL, Invivogen) diminuée de 21,56% par rapport aux souris naïves. A j+6, la diminution était égale à 14% (n=11-16 souris/groupe de 2 expériences indépendantes, post-test d'ANOVA unidirectionnelle et de Bonferroni, \*\* : p=0.0041) ([Figure 3]).

20

## Exemple 2

Dans cet exemple, les inventeurs montrent que la capacité de neutralisation diminuée semble être due à un transport inverse de LPS altéré chez les souris allo-receveuses.

25

La transport inverse de LPS (RLT) est une voie métabolique analogue à celle du transport inverse de cholestérol dans laquelle les substances lipophiles sont transportées au foie par des lipoprotéines (principalement HDL) afin d'être recyclées ou éliminées dans la bile.

30

La protéine de transfert de phospholipide (PLTP) est un acteur important du RLT capable de charger le LPS sur la HDL. Les inventeurs ont montré que son activité, mesurée par un kit disponible commercialement, était légèrement diminuée par l'irradiation totale du corps (j+3 après la transplantation) et par l'administration de lymphocytes T allogéniques (j+6) (n=18-21 souris/groupe de 3 expériences

35

indépendantes, post-test d'ANOVA unidirectionnelle et de Bonferroni, \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ ) ([Figure 4]).

Néanmoins, les inventeurs ont mis en évidence que l'activité PLTP n'était pas l'effecteur majeur dans le contexte de la GvHD dans la mesure où son absence totale n'empirait pas la survie des souris allo-greffées. Dans ce modèle, des souris C57Bl/6 irradiées de manière létale (10 Gy) *Pltp*<sup>+/+</sup> ou *Pltp*<sup>-/-</sup> ont été greffées avec  $20 \times 10^6$  moelle osseuse et  $5 \times 10^6$  lymphocytes T spléniques de donneurs C57Bl/6 (syngéniques, syng) ou C3H (allogéniques, allo) (n=12-17 souris/groupe de 2 expériences indépendantes, test de log-rank,  $p=0.5338$ ) ([Figure 5]).

Les inventeurs ont montré que le facteur limitant principal semblait être la disponibilité des transporteurs de LPS dans la mesure où une chute précoce (j+6) de la concentration plasmatique en HDL a été observée dans deux modèles de souris GvHD. La [Figure 6] figure 6 montre les résultats obtenus avec le modèle C57Bl/6→BALB/c (n=3-11 souris/groupe de 2 expériences indépendantes, post-test de Kruskal-Wallis et de Dunn,  $p=0.0021$  versus naïve et  $p=0.0018$  versus syng).

### Exemple 3

Dans cet exemple, les inventeurs montrent que la perte de la synthèse d'apolipoprotéine et d'HDL circulante augmente la gravité de la GvHD.

Afin d'étudier l'effet prépondérant du HDL dans le RLT dans le contexte d'une GvHD, des souris C57Bl/6 irradiées de manière létale (10 Gy) exprimant (WT) ou non (*ApoA1*<sup>tm1Unc</sup>) le gène de l'apolipoprotéine A1 (ApoA1) ont été greffées avec  $20 \times 10^6$  moelle osseuse et  $5 \times 10^6$  lymphocytes T spléniques de donneurs C57Bl/6 (syngéniques, syng) ou C3H (allogéniques, allo).

ApoA1 est l'apolipoprotéine majeure pour la mise en forme du HDL et les inventeurs ont montré que son absence aggravait la chute du HDL dans les souris allo-receveuses *ApoA1*<sup>tm1Unc</sup> (j+6), menant à presque aucun HDL circulant dans le plasma (0.067 g/l) (n=6 souris/groupe de 2 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney, \*\* :  $p=0.0022$ ) ([Figure 7]).

Les inventeurs ont montré que l'absence de HDL chez les souris allo-receveuses exacerbait la mortalité et la gravité de la GvHD après transplantation (n=9-19 souris/groupe de 3 expériences indépendantes, test du log-rank pour la survie, \*\*\*  $P = 0,0003$  et post-tests de Kruskal-Wallis et de Dunn sur l'ASC pour le score clinique, \*\*  $P = 0,0029$ ) ([Figure 8]).

14

Les inventeurs ont enfin montré que l'absence de HDL semblait être associée à une capacité altérée de neutralisation des LPS, évaluée par la méthode des cellules rapporteurs HEK-Blue TLR4 / CD14 / MD-2 (données préliminaires, n=3 souris/groupe de 1 expérience) ([Figure 9]).

5

#### Exemple 4

Dans cet exemple, les inventeurs montrent que la perte de la synthèse d'apolipoprotéine ApoA1 et d'HDL circulant accélère la maturation des cellules dendritiques et favorise la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T dans la rate.

10

La maturation des cellules dendritiques conventionnelles (DC) ([Figure 10]) et la polarisation des lymphocytes T ([Figure 11]) ont été évaluées, par cytométrie en flux 6 jours après la transplantation, au niveau de la rate de souris C57Bl/6 irradiées de manière létale (10 Gy) exprimant (WT) ou non (*Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*) le gène de ApoA1 et greffées avec  $20 \times 10^6$  moelle osseuse et  $5 \times 10^6$  lymphocytes T spléniques provenant de donneurs C57Bl/6 (syngéniques, syng) ou C3H (allogéniques, allo).

15

Les inventeurs ont montré que le nombre absolu de DC CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>IA-IE<sup>+</sup> vivantes était significativement augmenté dans la rate des souris receveuses *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*. Ces DC présentent une expression accrue des marqueurs de maturation (CD80 et CD86) par rapport aux DC de souris allo-greffées WT en ce qui concerne le pourcentage de cellules exprimantes et le nombre absolu de cellules, ainsi que le niveau d'expression de CD86 et des molécules du CMH de classe II apprécié par l'intensité moyenne de fluorescence (Figure 10).

20

Les inventeurs ont également montré que le nombre absolu de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> spléniques vivantes était augmenté chez les receveuses *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>*. Les proportions de cellules exprimant l'IFN- $\gamma$  parmi les cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (lymphocytes Th1) et les cellules CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (lymphocytes Tc1) étaient plus élevées chez les receveurs *Apoa1<sup>tm1Unc</sup>* et représentaient un nombre de cellules absolu supérieur après 4 heures de stimulation au phorbol-myristate-acétate/ionomycine (Figure 11) (n = 11-12 souris/groupe de 3 expériences indépendantes, test t non apparié ou test de Mann-Whitney, \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001).

25

30

#### Exemple 5

35

15

Dans cet exemple, les inventeurs montrent que la perfusion d'HDL réduit l'intensité de la GvHD et neutralise le LPS disponible.

5 Pour tester l'intérêt de l'utilisation prophylactique de la perfusion de HDL pour modérer la gravité de la GvHD, des receveuses BALB/c irradiées de manière létale (8,5 Gy) greffés avec  $5 \times 10^6$  moelle osseuse déplétée en cellules T et  $1 \times 10^6$  lymphocytes T spléniques de donneurs BALB/c (syngéniques, syng) ou C57Bl/6 (allogéniques, allo) ont été traitées par perfusion intraveineuse de HDL isolé à partir de plasma humain (20 mg/kg de poids corporel) trois fois par semaine entre j-1 et j+24 après la transplantation.

10 Les inventeurs ont montré que la perfusion de HDL réduisait la mortalité et la gravité de la GvHD chez les souris allo-greffées (n=19-39 souris/groupe de 4 expériences indépendantes, test de log-rank pour la survie et post-test ANOVA unidirectionnelle et de Bonferroni sur l'ASC pour le score clinique, \*\*\*\* p <0,0001) ([Figure 12]).

15 Les inventeurs ont également montré que la perfusion de HDL isolé rétablissait le niveau de HDL en circulation à j+6 (n=10-11 souris/groupe de 3 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney, \* P = 0,0232) ([Figure 13]).

20 Les inventeurs ont enfin montré que la perfusion de HDL semblait diminuer la concentration de 3HM dans le plasma et la bile des souris allo-greffées (n=9-13 souris/groupe de 4 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney). Les niveaux plasmatique et biliaire de 3HM étaient fortement corrélés à la concentration de HDL circulant (n = 26 et 19 paires respectivement, test de corrélation de Spearman non paramétrique, \*\*\*\* p <0,0001) ([Figure 14]). Les concentrations de 3HM détectées par la technique Endoquant® représentent la quantité totale de LPS présente dans les liquides biologiques.

25

### Exemple 6

30 Dans cet exemple, les inventeurs présentent des données préliminaires montrant que la perfusion d'HDL pourrait limiter l'inflammation systémique associée à la GvHD aiguë.

35 Les données préliminaires obtenues par les inventeurs suggèrent qu'une perfusion intraveineuse de HDL isolé à partir de plasma humain (20 mg/kg de poids corporel) trois fois par semaine pourrait diminuer l'inflammation systémique provoquée par la GvHD aiguë chez des receveuses BALB/c irradiées de manière létale (8,5 Gy) greffées avec



16

5×10<sup>6</sup> moelle osseuse déplétée en lymphocytes T et 1×10<sup>6</sup> lymphocytes T spléniques provenant de donneurs C57Bl/6 (allo).

Les inventeurs ont montré que la perfusion de HDL semblait limiter le niveau plasmatique du biomarqueur intestinal de la GvHD aiguë REG-3γ à j+15 après la transplantation (n=8 souris/groupe de 1 expérience) ([Figure 15]).

Les inventeurs ont également montré que les taux de cytokines inflammatoires circulantes avaient tendance à être diminués par la perfusion de HDL : l'interleukine-6 (IL-6) était deux fois plus faible à j+6 (n=4 souris/groupe de 1 expérience) et le facteur de nécrose tumorale-α (TNF-α) est diminué de 30% à j+15 (n=3 souris/groupe de 1 expérience) ([Figure 16]).

Les inventeurs ont enfin montré que les niveaux de CD14 soluble (sCD14) étaient légèrement diminués dans le plasma des souris recevant une perfusion de HDL (-20% à j+6 et -60% à j+15) (n=3 souris/groupe de 1 expérience) ([Figure 17]). Le CD14 soluble est un biomarqueur inflammatoire, car il est régulé positivement par la stimulation du LPS et reflète l'activation de TLR4/MD2/CD14 (récepteur du LPS). Le CD14 soluble peut également faciliter le transfert de LPS au HDL.

**REVENDICATIONS**

5           1.    Lipoprotéine de haute densité (HDL), mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, chez un sujet.

10           2.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon la revendication 1, dans lequel la HDL est isolée de sang de donneur sain.

15           3.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon la revendication 1, dans lequel l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL est l'apolipoprotéine A1.

20           4.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la HDL, mimétique de HDL, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL est administré par voie intraveineuse.

25           5.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel la HDL, mimétique de HDL, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL est administré de manière répétée, de préférence tous les deux jours.

30           6.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la GvHD est la GvHD aiguë.

35           7.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, pour prévenir la GvHD, dans lequel le sujet va subir une greffe de cellules hématopoïétiques.

          8.    HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon la revendication 7, dans lequel la HDL, le mimétique de

18

HDL, ou l'activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL est administré avant et après la greffe de cellules hématopoïétiques.

5           **9.**     HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, pour traiter la GvHD, dans lequel le sujet a subi une greffe de cellules hématopoïétiques.

10           **10.**     HDL, mimétique de HDL, ou activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, pour prévenir et/ou traiter le syndrome de relargage des cytokines, dans lequel le sujet est traité avec des lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T).

15

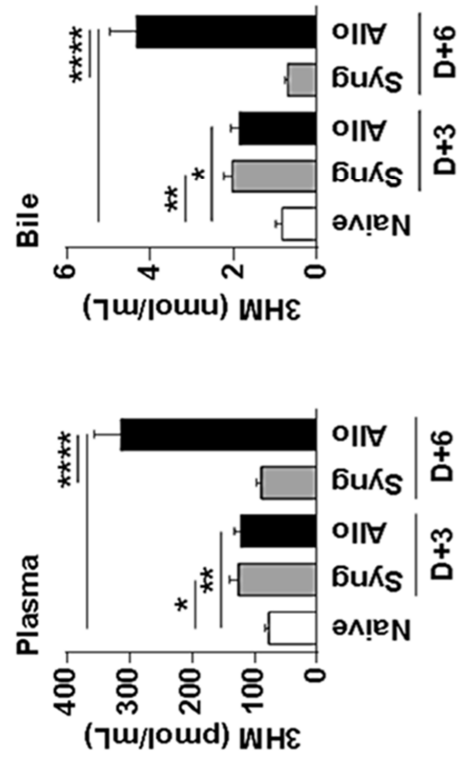
**ABREGE**

**Utilisation de HDL dans la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte**

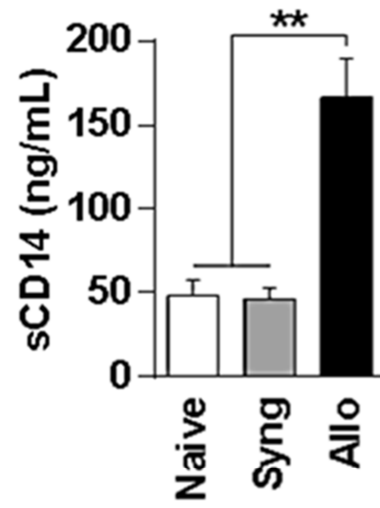
La présente invention concerne une lipoprotéine de haute densité (HDL), un mimétique de HDL, ou un activateur de la formation et/ou de la maturation de HDL pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) ou du syndrome de relargage des cytokines, chez un sujet.

Figure pour l'abrégé : néant

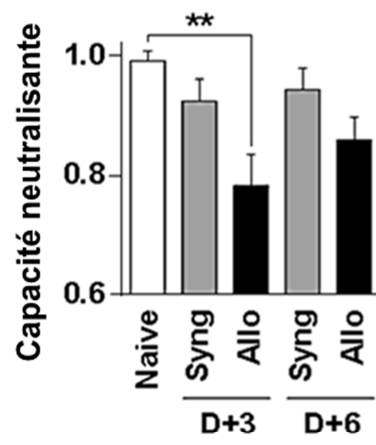
[Fig 1]



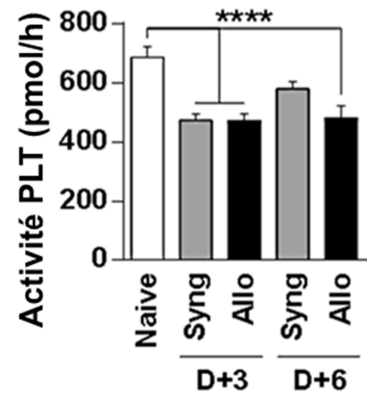
[Fig 2]



[Fig 3]

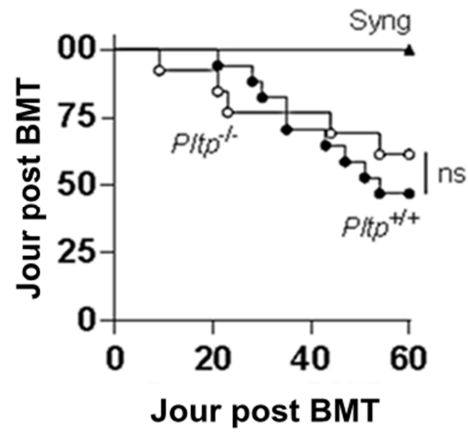


[Fig 4]

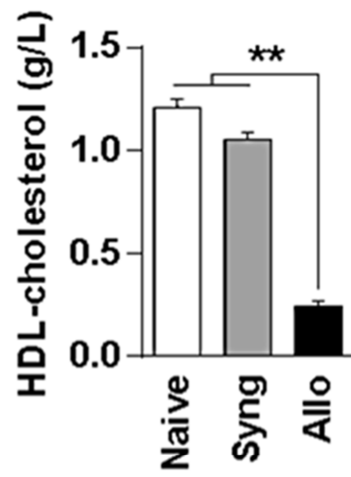




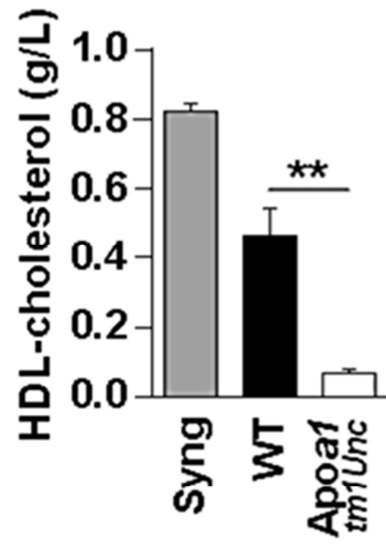
[Fig 5]



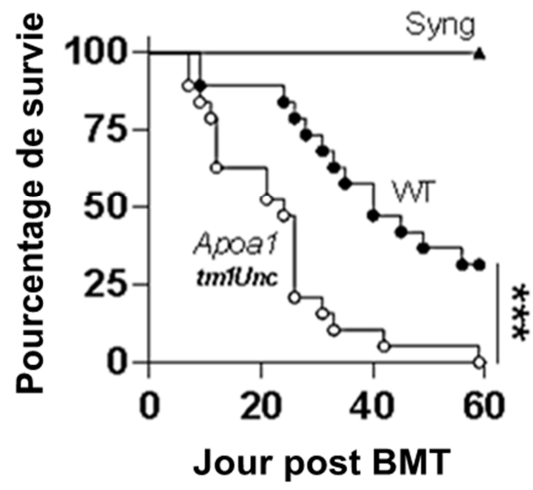
[Fig 6]



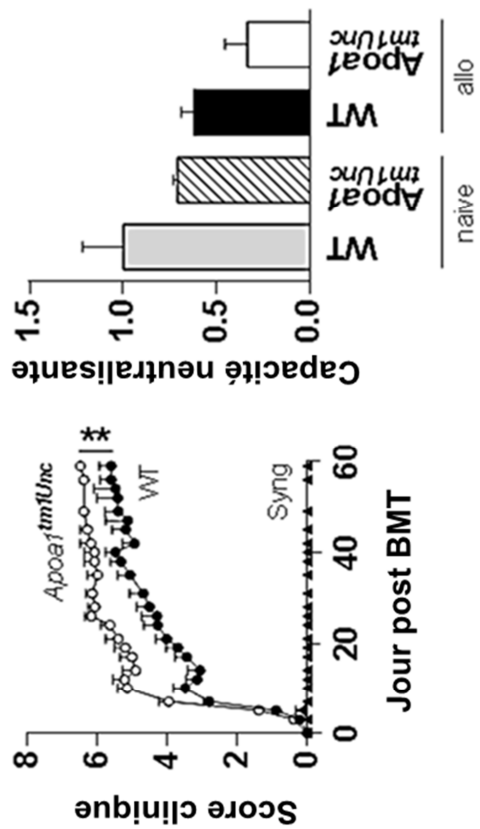
[Fig 7]



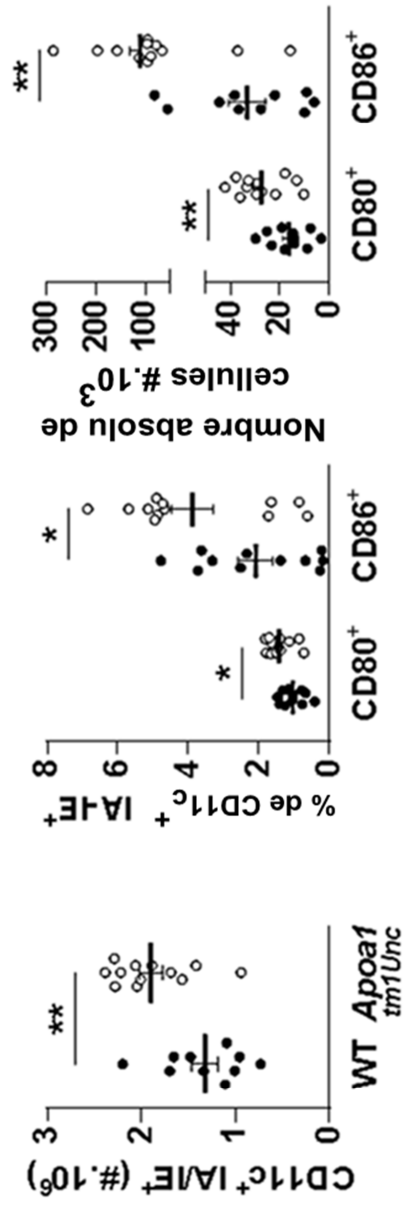
[Fig 8]



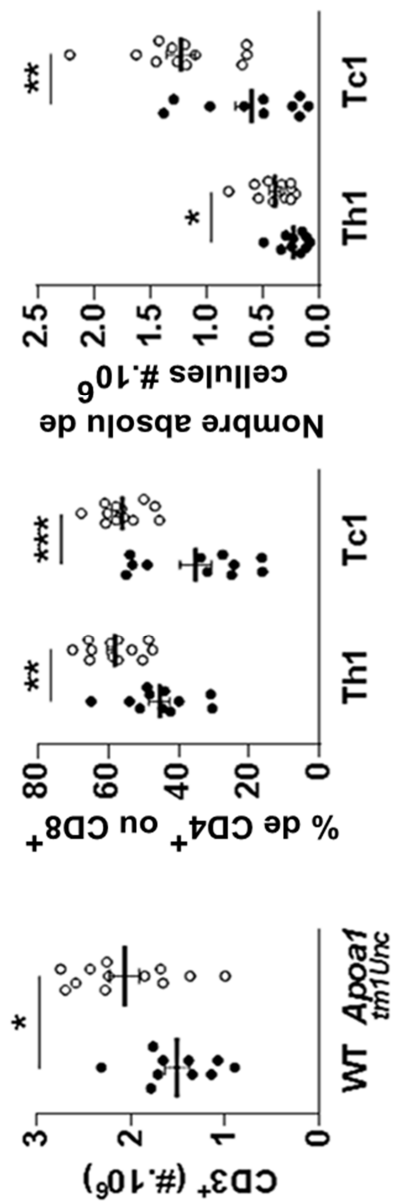
[Fig 9]



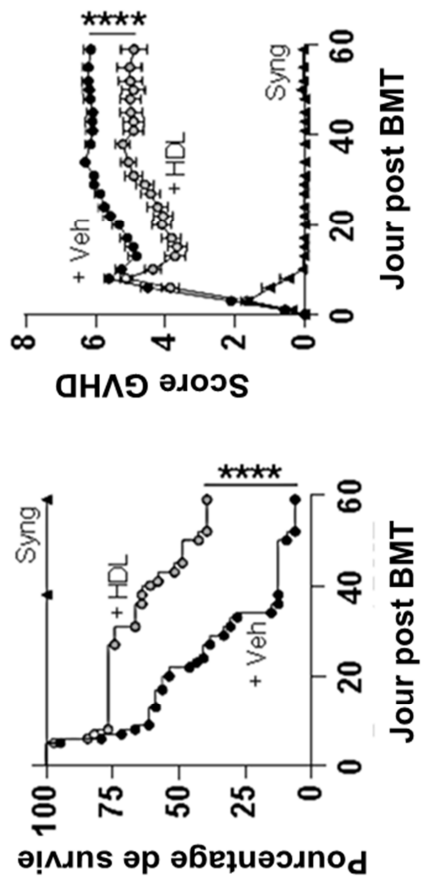
[Fig 10]



[Fig 11]

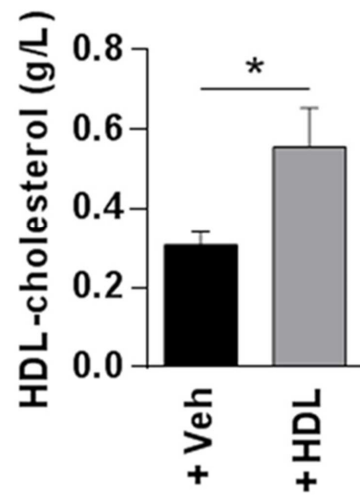


[Fig 12]

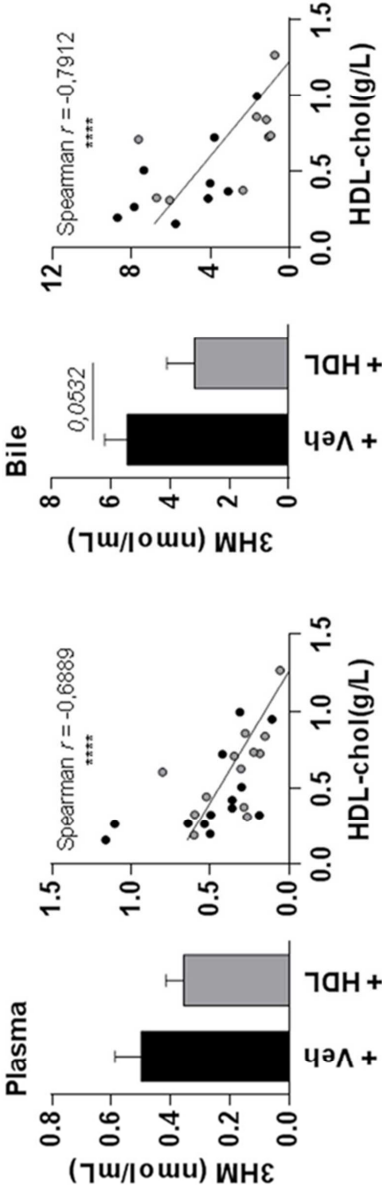




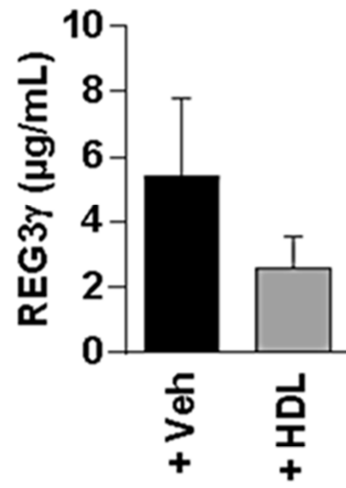
[Fig 13]



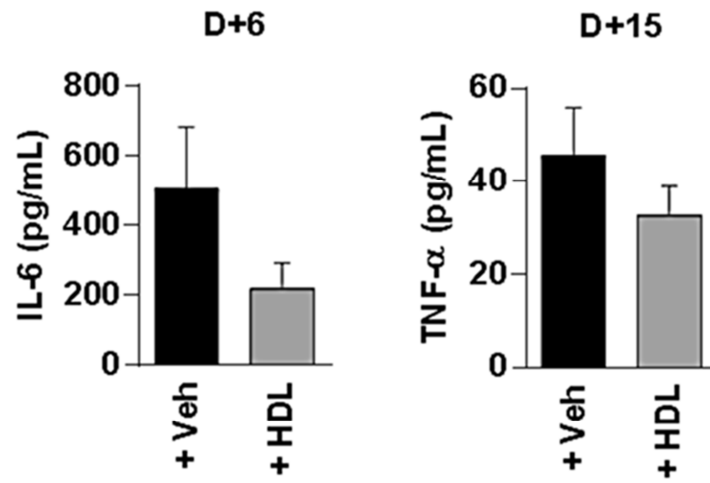
[Fig 14]



[Fig 15]



[Fig 16]



[Fig 17]

