



HAL
open science

Implications des polymorphismes MIC-A / NKG2D dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémopathies malignes

Marie-Joëlle Apithy

► **To cite this version:**

Marie-Joëlle Apithy. Implications des polymorphismes MIC-A / NKG2D dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémopathies malignes. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-02333600

HAL Id: dumas-02333600

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02333600>

Submitted on 25 Oct 2019

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

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



Université de Picardie Jules Verne
U.F.R. DE PHARMACIE
Année Universitaire 2016/2017

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 24 mars 2017
Par Mme APITHY Marie-Joëlle

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
Tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Implications des polymorphismes MIC-A / NKG2D dans l'allogreffe de
cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémopathies
malignes**

Membres du Jury :

Président : Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens

Assesseurs : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre, CHU Amiens

Monsieur le Professeur DUVERLIE Gilles, CHU Amiens

Monsieur le Docteur GUILLAUME Nicolas, CHU Amiens

Madame le Docteur DESOUTTER Judith, CHU Amiens

Mémoire N° 14



Université de Picardie Jules Verne
U.F.R. DE PHARMACIE
Année Universitaire 2016/2017

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 24 mars 2017
Par Mme APITHY Marie-Joëlle

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
Tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Implications des polymorphismes MIC-A / NKG2D dans l'allogreffe de
cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémopathies
malignes.

Membres du Jury :

Président : Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens

Assesseurs : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre, CHU Amiens

Monsieur le Professeur DUVERLIE Gilles, CHU Amiens

Monsieur le Docteur GUILLAUME Nicolas, CHU Amiens

Madame le Docteur DESOUTTER Judith, CHU Amiens

Mémoire N° 14

MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

(Tenant lieu de Thèse en vue du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)

Nom : Apithy

Prénom : Marie-Joëlle

Titre du mémoire/Thèse : Implications des polymorphismes MIC-A / NKG2D dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez des patients atteints d'hémopathies malignes.

Mots-clés : Polymorphisme, MIC-A, NK, NKG2D, GVH, CSH

Résumé : MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) est un gène hautement polymorphe étroitement lié au locus du gène HLA B de classe I, par un déséquilibre de liaison. Ce gène code pour une glycoprotéine, dont l'expression accrue dans les cellules soumises à un stress (cellules infectées et cellules tumorales) est à l'origine de l'activation du récepteur NKG2D exprimé à la surface des cellules NK et des lymphocytes TCD8+. Les polymorphismes MICA influencent l'interaction avec NKG2D. Sur une cohorte de 124 allogreffes de cellules souches hématopoïétiques géno et phéno-identiques (10/10), nous avons étudié les polymorphismes MICA-129 et A5.1 chez le receveur et les polymorphismes NKG2D (NKC3, NKC4) chez le donneur afin d'évaluer leur impact sur la survenue de GVH (graft versus host disease) aiguë et chronique, la survie globale et la survie sans rechute. En analyse univariée, les receveurs hétérozygotes pour la mutation A5.1 ($p=0.03$) ainsi que le polymorphisme NKC4 C/C ($p=0.013$) chez les donneurs sont associés à la survenue de GVH aiguë. MICA A5.1 hétérozygote est également associé à de la GVH chronique ($p=0.04$). Le polymorphisme *valine/valine* chez le receveur semble être lié à la survenue de GVH chronique sans être statistiquement significatif. Ces données suggèrent que les statuts MICA receveurs et NKG2D donneurs, associés à une faible activité cytotoxique, sont des facteurs de risques augmentant l'incidence de GVH aiguë selon un mécanisme devant être élucidé.

Membres du Jury :

Président : Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens

Asseseurs : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre, CHU Amiens

Monsieur le Professeur DUVERLIE Gilles, CHU Amiens

Monsieur le Docteur GUILLAUME Nicolas, CHU Amiens

Madame le Docteur DESOUTTER Judith, CHU Amiens

MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

(Tenant lieu de Thèse en vue du diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)

Nom : Apithy

Prénom : Marie-Joëlle

Titre du mémoire/Thèse: MICA and NKG2D polymorphisms have a significant impact on acute graft versus host disease after HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation.

Mots-clés: Polymorphism, MIC-A, NK, NKG2D, GVH, HSCT

Résumé: MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) is a highly polymorphic gene closely linked to the HLA-B locus. It encodes a cell stress inducible glycoprotein, which mediates an activatory signal towards the NKG2D receptor expressed on NK-cells, CD8+ $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ -T-cells and NKT-cells. MICA polymorphisms have been shown to influence NKG2D signaling. Here, we evaluated whether recipient MICA and donor NKG2D polymorphisms (respectively MICA-129, MICA A5.1 and NKC3, NKC4) could influence the incidence of graft versus-host disease (GVH), overall survival (OS) and relapse free survival (RFS) on 124 patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using an HLA-matched donor (10/10). In an univariate model, MICA genes mismatch between recipient and donor pairs ($p=0.023$), recipient MICA A5.1 heterozygosity ($p=0.030$), donor NKC4 C/C polymorphism ($p=0.013$) are associated with the increase of incidence of acute GVH (grade I to IV). Recipient MICA A5.1 heterozygosity is also associated with chronic GVH ($p=0.04$) while Recipient MICA-129 *val/val* tends to be a risk factor of chronic GVH without being statistically significant. These polymorphisms have no significant impact on OS and RFS in our study. Our data suggest that a MICA or NKG2D low activity status can be related to an increase of acute GVH according to a mechanism that remains to be elucidated.

Membres du Jury :

Président : Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens

Assesseurs : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre, CHU Amiens

Monsieur le Professeur DUVERLIE Gilles, CHU Amiens

Monsieur le Docteur GUILLAUME Nicolas, CHU Amiens

Madame le Docteur DESOUTTER Judith, CHU Amiens

Remerciements

A mon Président de Thèse :

Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Chef de service du laboratoire d'Hématologie-Histocompatibilité

Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens

Pour avoir accepté sans hésitation la présidence de mon jury de thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A mes assesseurs :

Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Chef du service d'Hématologie clinique et thérapie cellulaire

Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens

Pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE

Doyen de la faculté de Pharmacie

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Laboratoire de virologie

Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse, et de l'intérêt porté à ce travail. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Madame le Docteur Judith DESOUTTER

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie et d'Histocompatibilité

Laboratoire de Thérapie cellulaire

Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens

Je tiens à te remercier pour tes précieux conseils, ton encadrement très professionnel et pour ces nombreuses heures passées à corriger mon manuscrit. Sois assurée de ma plus grande considération.

A mon Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Nicolas GUILLAUME

Laboratoire d'Hématologie et d'Histocompatibilité

Centre Hospitalo-Universitaire d'Amiens

Tout d'abord, je tiens à te remercier pour ce travail que tu m'as confié. Merci également pour ton humanité, ta confiance, ta rigueur, et de la grande disponibilité dont tu as fait preuve à mon égard. Sois assuré de mon profond respect.

Aux personnes qui ont participé à ce projet :

A mes collègues HLA : Ségolène, Carole, Anne, Sylvie, Véronique, Danièle, Aline, merci de m'avoir accueillie comme vous l'avez fait. Grâce à vos taquineries au quotidien, je travaille sur ma susceptibilité. Mon entourage (et moi-même) vous en remercie.

Au Docteur CHARBONNIER Amandine, au Docteur MOREL Pierre et à toute l'équipe d'hématologie clinique pour leur participation et leur grande disponibilité.

A Momar DIOUF, pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Au service d'onco-biologie moléculaire, pour votre aide et votre patience.

Plus largement au service d'Hématologie et à tous mes collègues du CBH :

Merci pour vos compétences et tout l'enseignement reçu lors de mes stages.

A mes amis du lycée :

Claire, je me dis chaque jour que je n'y serais pas arrivée si tu n'avais pas été à mes côtés.

Hector, merci de m'avoir épargné ce jour dans cette classe, Cécile, merci pour ta présence et ton soutien, en espérant t'avoir éclairé sur les origines de R2D2☺.

Aline, merci de m'avoir accueilli comme une sœur et comme une amie.

Agathe et tous les autres, merci pour tous ces bons moments.

A mes amis de Fac :

Rooky, Penchou, Audrey, Mathilde, Marion, Chloé, Fabien, Booky, Alice, Juju, merci pour ces belles et inoubliables années de fac. Et promis Fabien, plus de fard à paupière blanc.

A tous mes co-internes (les meilleurs se reconnaîtront !), merci pour tous ces fous rires.

A ma famille :

Merci de m'avoir soutenu et surtout de m'avoir supporté au quotidien, et Dieu sait que ce n'est pas chose facile !

Alex, Tu as pris la relève de me supporter au quotidien, merci de tout le soutien que tu m'as apporté, merci pour tous ces bons moments passés et à venir, merci d'être là, merci d'être toi.

Liste des abréviations

ADCC: *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity*, Cytotoxicité Dépendante des Anticorps

BSA: *Body Surface Area*, surface corporelle

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigènes

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV: Cytomégalovirus

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

CSP: Cellules Souches Périphériques

EBMT: *European Society for Blood and Marrow Transplantation*

EFS: *Event Free Survival*, Survie sans évènement

G-CSF : *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, Facteur stimulant la granulopoïèse

GVL : *Graft Versus Leukemia*, Réaction du greffon contre la leucémie

GVH: *Graft Versus Host*, Réaction du greffon contre l'hôte

HLA: *Histocompatibility Leucocyte Antigen*, Antigène leucocytaire d'histocompatibilité

ICT: Irradiation Corporelle Totale

IFN: Interféron

ITAM: Immunoreceptor *Tyrosine-based Activation Motif*, motif d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine

ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*, motif d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine

LAM: Leucémie Aigüe Myéloïde

LAL: Leucémie Aigüe Lymphoïde

LCDP: Leucémie à Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

LFS: *Leukemia Free Survival*, survie sans leucémie

LH: Lymphome Hodgkinien

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMMC : Leucémie Myélomonocytaire Chronique

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LP : Leucémie à plasmocytes

LTCD8+ : Lymphocytes T CD8+

MAC : *Myéloablative Conditioning*, Conditionnement myéloablatif

MO : Moelle Osseuse

NGS : *Next Generation Sequencing*, Séquençage nouvelle génération

NIH: *National Institutes of Health*

NK: *Natural killer*

NKG2D: *Natural Killer Group 2 D*

NRM: *Non Relapse Mortality*, Mortalité sans rechute

OR: Odd Ratio

PFS: *Progression Free Survival*, Survie sans progression

RC: Rémission Complète

RIC: *Reduce Intensity Conditioning*, Conditionnement d'intensité réduit

RFS: *Relapse Free Survival*, Survie sans rechute

RP: Rémission Partielle

RTC: *Reduce Toxicity Conditioning*, Conditionnement de toxicité réduite

SAL: Sérum anti lymphocytaire

SMD: Syndrome Myélodysplasique

SMP: Syndrome Myéoprolifératif

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SSO: *Sequence Specific Oligonucleotide*

SSP: *Single Specific Primers*

TBI: *Total Body Irradiation*, irradiation corporelle totale

TRM: *Treatment Related Mortality*, Mortalité liée au traitement

OS: *Overall Survival*, Survie globale

Tables des Illustrations

Figure 1: Localisation des molécules de CMH de classe I, II et III sur le chromosome 6 ⁽¹⁾	18
Figure 2: Transmission des haplotypes des parents aux enfants	19
Figure 3: Algorithme décisionnel concernant le choix des donneurs, d'après ⁽⁷⁾	20
Figure 4: Chronologie des complications de la greffe de cellules souches hématopoïétiques ⁽²⁵⁾	29
Figure 5: Modèle de développement in vivo des différents stades des cellules NK humaines ⁽⁴⁸⁾	31
Figure 6: Phénotypes et fonctions des cellules NK ⁽⁵¹⁾	32
Figure 7: Mécanismes d'activation et d'inhibition des cellules NK ^{(53),(54)}	34
Figure 8: Voie de signalisation des différents récepteurs NKG2 (44).....	36
Figure 9: Association du récepteur NKG2D, des molécules adaptatrices DAP10 et leurs expressions par les leucocytes et les cellules NK (modèle murin) ⁽⁶²⁾	37
Figure 10: Localisation du gène MIC-A sur le chromosome 6 ⁽⁷³⁾	40
Figure 11: Structure et polymorphisme des ligands du récepteur NKG2D ⁽⁷⁶⁾	40
Figure 12: Séquence d'un allèle MICA A5.1, insertion d'un nucléotide G. (SeqPilot®)	41
Figure 13: Structure de la molécule MIC-A sans et avec mutation A5.1 ⁽⁶⁸⁾	42
Figure 14: Principe du séquençage de Sanger, électrophorégramme à interpréter sur le logiciel SeqPilot®	47
Figure 15: Migration d'amplicons post PCR de l'exon 2 de l'allèle MIC-A sur gel d'agarose.....	49
Figure 16: PCR en temps réel, méthode des sondes fluorescentes.....	52
Figure 17: Interprétation du polymorphisme NKC3.	53
Figure 18: Délai de survenue de GVH aiguë en fonction du polymorphisme A5.1 en risque compétitif	62
Figure 19: OS en fonction de la mutation A5.1 chez le receveur, $P=0,86$	63
Figure 20: RFS en fonction de la mutation A5.1 chez le receveur, $P=0.91$	64
Figure 21: Délai de survenue de GVH aiguë en fonction du polymorphisme NKC4 chez les donneurs	66
Figure 22: OS en fonction de NKC4 du donneur, $P= 0.806$	67
Figure 23: RFS en fonction de NKC4 du donneur $P=0.989$	67
Tableau 1: Indications des allogreffes et autogreffes d'après (7).....	23
Tableau 2: Différents stades de la GVH aiguë en fonction des 3 principaux organes atteints d'après ^{(25),} ⁽²⁶⁾	26

Tableau 3: Différents grades en fonction des atteintes des 3 principaux organes lors d'une GVH aiguë d'après ^{(25), (26)et (27)}	26
Tableau 4: Activité cytotoxique en fonction des polymorphismes NKC3 et NKC4 d'après ⁽⁶⁶⁾	39
Tableau 5: Caractéristiques cliniques de la population étudiée.....	45
Tableau 6: Séquences des <i>primers</i> utilisés pour l'étude des exons 2,3 et 5 du gène MIC-A	48
Tableau 7: Mélange réactionnel pour la PCR MIC-A.....	48
Tableau 8: Mélange réactionnel de la réaction de séquence du gène MIC-A	50
Tableau 9: Mélange réactionnel PCR en temps réel, Polymorphisme NKG2D.....	53
Tableau 10: Répartition des polymorphismes de l'exon 5 chez les patients et leurs donneurs	55
Tableau 11: Répartitions des polymorphismes retrouvés au sein des populations.....	55
Tableau 12: Allèles MIC-A donneurs, receveurs	56
Tableau 13: Tableau de contingence, génotypage 008 et allèle A5.1	57
Tableau 14: Association significative du génotypage 008 et de l'allèle A5.1, $p < 0,05$	57
Tableau 15: Relations entre génotypage et polymorphisme au niveau de l'exon 5 chez les donneurs et les receveurs	57
Tableau 16: Résultats des mutations A5.1, polymorphismes MIC-A 129 et NKG2D chez receveurs et donneurs.	59
Tableau 17: GVH aiguë et chronique en fonction des polymorphismes receveurs.....	60
Tableau 18: risque de développement de la GVH aiguë chez les receveurs hétérozygotes pour la mutation A5.1.....	61
Tableau 19: Tableau de contingence, A5.1 hétérozygotes, receveurs.....	61
Tableau 20: A5.1 hétérozygotes, receveurs.....	61
Tableau 21: OS en fonction de la mutation A5.1, receveurs.....	63
Tableau 22: RFS en fonction de la mutation A5.1, receveurs.....	64
Tableau 23: Tableau de contingence, polymorphisme NKC4 des donneurs.....	65
Tableau 24: Polymorphisme NKC4 C/C des donneurs.....	65
Tableau 25: OS en fonction de NKC4.....	66
Tableau 26: RFS en fonction de NKC4.....	67
Tableau 27: Risque de GVH chronique en fonction du sexe du donneur.	68
Tableau 28: Absence d'impact sur la GVH aiguë.....	68
Tableau 29: Absence d'impact sur la GVH chronique	69
Tableau 30: Absence d'impact sur l'OS	69
Tableau 31: Absence d'impact sur la RFS.....	70
Tableau 32: Absence d'impact sur la TRM	71

SOMMAIRE

I. Préambule.....	17
II. Le Complexe Majeur d’Histocompatibilité.....	17
III. L’Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	19
A. Définition.....	19
B. Les différentes sources cellulaires.....	21
a) La moelle osseuse.....	21
b) Les cellules souches périphériques.....	21
c) Le sang de cordon.....	21
C. Indications cliniques.....	22
D. Conditionnements.....	24
E. Complications de l’allogreffe.....	24
a) La GVH.....	24
1. GVH aiguë.....	25
2. GVH chronique.....	27
3. Prophylaxie de la GVH.....	27
b) Le rejet et la rechute.....	28
c) Les complications infectieuses.....	28
d) Autres complications non immunologiques.....	29
IV. Les cellules NK.....	29
A. Définition.....	29
B. Développement, phénotype et fonction.....	30
C. Education des cellules NK et tolérance du soi.....	33
D. Répertoire des cellules NK.....	35
a) Les récepteurs KIR et leurs ligands.....	35
b) Les récepteurs NCR et leurs ligands.....	35

c) Les récepteurs CD94 /NKG2A, B et C.....	36
d) Le récepteur NKG2D et ses ligands	37
E. Le récepteur NKG2D	37
a) Signalisation	37
b) Régulation du récepteur NKG2D	38
c) Polymorphisme du récepteur NKG2D	38
d) MIC-A, exemple d'un ligand du récepteur NKG2D	39
1. MIC-A A5.1	41
2. MIC-A 129	42
3. MIC-A solubles	42
V. Objectifs de l'étude	43
VI. Matériels et méthodes.....	44
A. Population étudiée : couples donneurs et receveurs	44
a) Critères d'inclusion	44
b) Critères d'exclusion.....	44
B. Méthodes	46
a) Extraction de L'ADN	46
b) Génotypage MIC-A par la méthode Sanger	46
1. Principe.....	46
2. Réactifs utilisés et choix des amorces	47
c) PCR en temps réel	51
1. Principe.....	51
2. Méthode des sondes fluorescentes.....	51
3. Etude du polymorphisme NKG2D par PCR en temps réel	52
d) Méthodes statistiques.....	54
VII. Résultats	54
A. Epidémiologie des polymorphismes MIC-A/NKG2D chez les receveurs/donneurs.....	54
a) Mutation A5.1 et polymorphismes au niveau de l'exon 5.....	54
b) Génotypage du gène MIC-A	56

c) Polymorphisme MIC-A 129	58
d) Polymorphisme NKG2D	58
B. Fréquence de survenue de GVH aiguë, GVH chronique, rechute et réactivation virale en fonction des polymorphismes MIC-A/NKG2D	59
C. Association significative de la mutation A5.1 chez le receveur avec la survenue de GVH aiguë et GVH chronique, sans impact sur la survie	61
D. Le polymorphisme NKC4 C/C (<i>LNK2/LNK2</i>) chez le donneur est associé à un risque de survenue de GVH aiguë chez le receveur sans impacter la survie (OS, RFS).	65
E. L'utilisation d'une donneuse « femme » pour un receveur « homme » impacte la survenue de GVH chronique	68
F. Paramètres non significatifs	68
a) GVH aiguë.....	68
b) GVH chronique	69
c) OS.....	69
d) RFS.....	70
e) Mortalité liée au traitement (TRM)	71
VIII. Discussion	72
A. En fonction de la mutation A5.1.....	72
B. En fonction du polymorphisme NKC4 LNK2/LNK2 (=C/C)	73
C. En fonction de MIC-A 129.....	74
D. En fonction du mis-match MIC-A.....	75
IX. Conclusion.....	77
X. Bibliographie.....	78

I. Préambule

L'allogreffe de Cellule Souches Hématopoïétiques est une indication fréquente dans le cadre d'hémopathies malignes myéloïdes et lymphoïdes et consiste en un apport de cellules souches allogéniques, étrangères au patient, qui vont reconnaître et éliminer les cellules tumorales. Ce contrôle anti tumorale réalisé par des effecteurs immuns constitue un des effets principalement recherché, on parle alors d'effet de réaction du greffon contre la leucémie (GVL). La présence de lymphocytes T dans le greffon permet un effet GVL mais s'accompagne également d'un effet de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) par présentation d'antigènes du soi via les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur, dont la sévérité varie et reste à l'origine d'un taux de morbidité et mortalité important. La maîtriser est une problématique actuelle. La déplétion en lymphocyte T diminue la GVH mais augmente le taux de rechute par une diminution en parallèle de l'effet GVL. L'application clinique des cellules NK est en investigation. Ces cellules sont en effet reconnues comme exerçant un effet cytotoxique et anti tumorale via un panel large de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Pour cela de nombreux marqueurs phénotypiques et fonctionnels des cellules NK sont en études. Plusieurs travaux explorent la possibilité de transfusion de cellules NK chez des patients atteints de pathologies hématologiques notamment des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) permettant une allo réactivité fonctionnelle des cellules NK du donneur tout en limitant le risque de GVH.

II. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) est un ensemble complexe de gènes codant pour des molécules qui vont assurer la fonction cellulaire de présentation de l'antigène. Chez l'homme, le CMH correspond aux antigènes de leucocytes humains (HLA). Des fragments peptidiques issus de la dégradation de protéines intracellulaires pour lesquelles il existe un polymorphisme génétique vont être ainsi présentés par les molécules de CMH aux cellules de l'immunité. Ces fragments représenteront pour une grande partie, les antigènes mineurs d'histocompatibilité lorsqu'il s'agira de peptide du soi. Les gènes du système HLA sont localisés sur le chromosome 6 chez l'homme (**Figure 1**). On distingue 3 classes de CMH. Le CMH de classe I correspond aux molécules HLA-A, B, C qui sont exprimées sur toutes les

cellules nucléées à l'exception des cellules neuronales et de certains tissus tels que la cornée ou les glandes salivaires. Le CMH de classe II correspond aux molécules HLA DR, DQ et DP dont l'expression à la surface est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes, notamment les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Le CMH de classe III quant à lui renferme des molécules n'intervenant pas dans la présentation antigénique. Les molécules HLA de classe I et II sont très polymorphes, codominantes et s'expriment simultanément à la surface cellulaire. Il existe une transmission par haplotype des parents aux descendants. Au sein d'une famille, la probabilité d'une compatibilité HLA entre frères ou sœurs est donc de 25% (Figure 2). Il existe également une association préférentielle entre deux allèles de deux loci différents, on parle de déséquilibre de liaison. La probabilité de trouver deux allèles associés est alors supérieure au simple hasard. Les molécules HLA jouent également un rôle dans l'histocompatibilité et interviennent dans les rejets de transplantations d'organes et de greffes de cellules souches hématopoïétiques. Lorsque deux patients sont identiques au niveau des molécules de classe I (A, B et C) et de classe II (DRB1, DQB1), nous sommes dans le cadre d'une compatibilité 10/10.

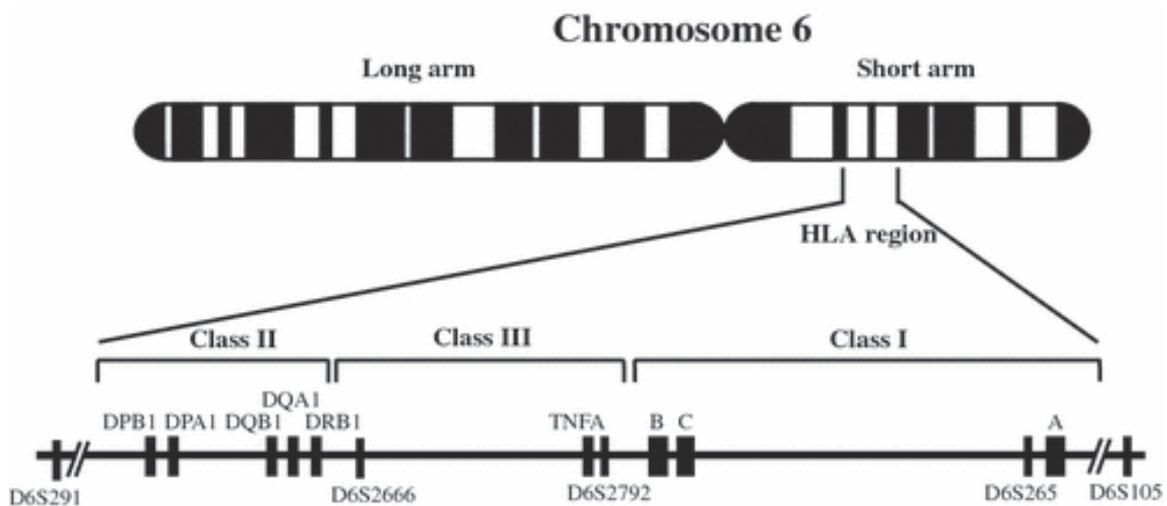


Figure 1: Localisation des molécules de CMH de classe I, II et III sur le chromosome 6 ⁽¹⁾

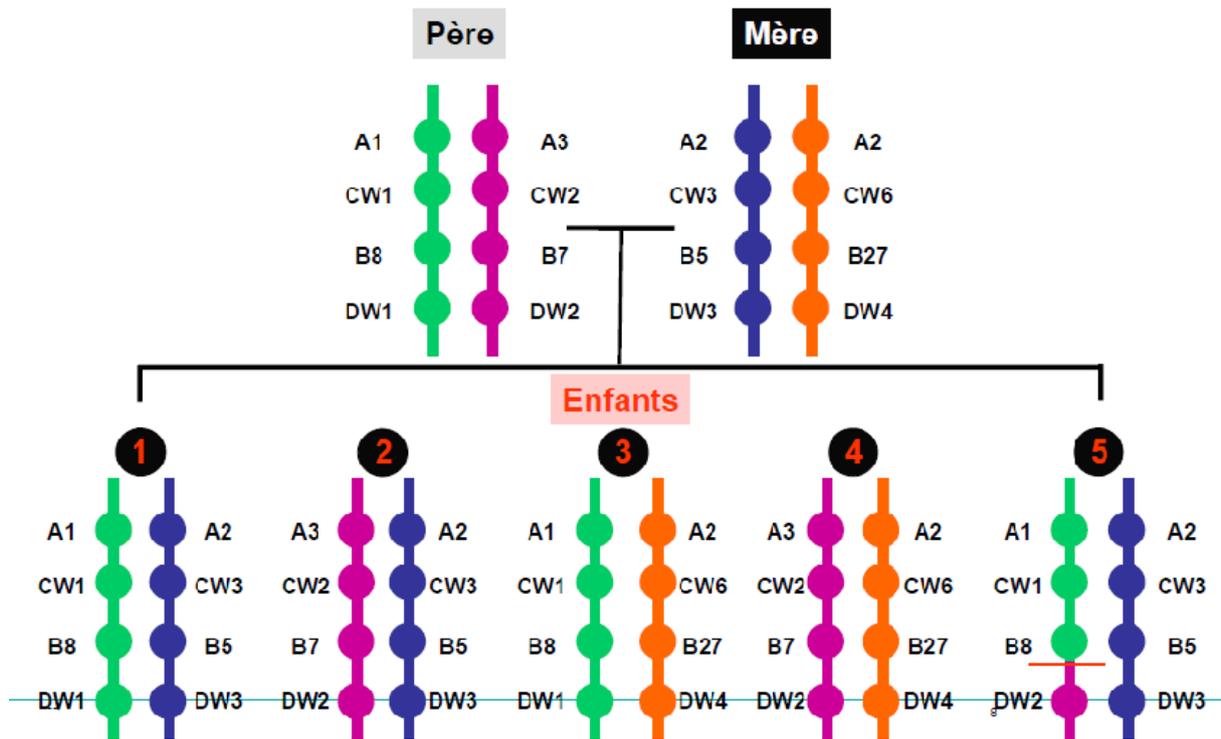


Figure 2: Transmission des haplotypes des parents aux enfants

III. L'Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

A. Définition

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est le traitement de choix de nombreuses affections hématologiques malignes. Elle consiste en un recueil de CSH chez un donneur, qui sont ensuite infusées chez un receveur ayant reçu en amont un conditionnement myéloablatif ou non (chimiothérapie +/- associée à une irradiation corporelle totale (ICT)). Elle est associée à une incidence élevée de morbidité et de mortalité liée à la procédure, limitant son indication à des patients jeunes, du fait d'une mortalité précoce proportionnelle à l'âge. La mise en place de conditionnements atténués ou non myéloablatifs (Reduced Intensity Conditioning) permet de s'affranchir de facteurs limitants tels que l'âge et la comorbidité⁽¹⁾. Il a clairement été établi que l'activité anti-tumorale de l'allogreffe provient non seulement de la destruction des cellules tumorales par les fortes doses de chimio-radiothérapie reçues lors du conditionnement, mais également par un effet GVL (Graft vs Leukemia) avec la lyse des cellules tumorales par les cellules immunitaires du donneur contenues dans le greffon⁽²⁾. L'effet GVL est recherché dans le but d'induire un effet anti-

tumoral et de permettre une immunodépression suffisante pour la prise du greffon en évitant les rejets tout en prévenant le risque de GVH⁽³⁾. La réalisation d'une allogreffe après chimiothérapie myéloablative a montré ses bénéfices, impliquant l'augmentation des taux de rémission complète et un plus faible risque de rechute comparé aux procédures d'autogreffe. Mais il persiste néanmoins un pourcentage non négligeable de mortalité imputable à la toxicité du traitement (20 à 50%) dans les 6 premiers mois⁽⁴⁾. L'allogreffe suppose un donneur de CSH différent du receveur. Il est en général demandé une compatibilité 10/10 pour les loci HLA de classe I (2A, 2B, 2C) et de classe II, (2DRB1, 2DQB1) entre couples donneurs et receveurs. Le donneur peut ainsi être un membre de la famille, on parlera alors de greffe géno-identique. A l'heure actuelle, seuls 30% des patients bénéficient de tels donneurs. Lorsqu'il n'y a pas de fratrie compatible, il est recherché un donneur phéno-identique dans le fichier national ou international de Donneur Volontaire de Moëlle⁽⁵⁾. Pour cela, un typage HLA du receveur et du donneur est effectué au laboratoire d'histocompatibilité par méthode sérologique (lymphocytotoxicité dépendante du complément) et/ou par biologie moléculaire (SSP, SSO en méthode Luminex®, séquençage Sanger, NGS). Dans certains cas, une moindre compatibilité peut être acceptée, on parlera alors de greffe alternative. Il s'agira alors de greffe « mis-match » (9/10 ou 8/10), de greffe haplo-identique (5/10 avec un donneur familial)⁽⁶⁾ ou encore de greffe de sang de cordon où une compatibilité 8/8 voire 6/6 (A, B, (C), DR) est possible⁽⁵⁾(figure 3).

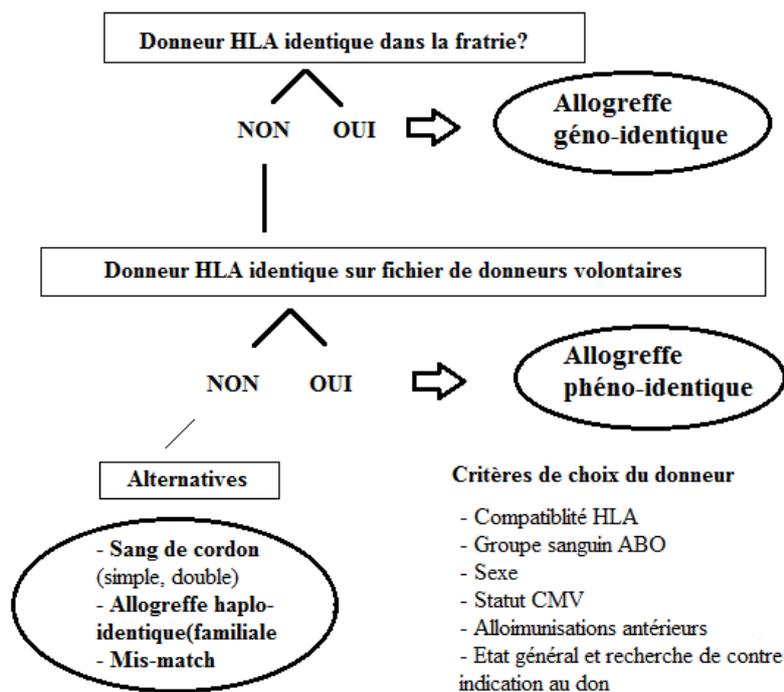


Figure 3: Algorithme décisionnel concernant le choix des donneurs, d'après ⁽⁷⁾

B. Les différentes sources cellulaires

a) La moelle osseuse

Utilisée lors des procédures d'allogreffes et d'autogreffes, elle sera préférée dans le cadre d'une greffe haplo-identique ou pour traiter des hémopathies non malignes. Elle est prélevée sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques. Le recueil d'un maximum de 20ml/kg de poids du donneur sera ainsi effectué afin d'obtenir 2 à $3 \cdot 10^8$ cellules nucléées/kg de poids du receveur.

b) Les cellules souches périphériques

Le sang périphérique adulte renferme physiologiquement peu de CSH mais celles-ci peuvent être mobilisées grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques, notamment le Colony-Granulocyte-Stimulating-Factor (G-CSF). Les CSH, comptabilisées alors en énumérant les cellules CD34+, sont ensuite recueillies par cytophérèse. Le choix des cellules souches périphériques (CSP) par rapport à la MO est lié à une sortie d'aplasie plus précoce grâce à une reconstitution hématologique plus rapide mais il existe un risque plus important de développer de la GVH. La richesse minimale recommandée est de $3 \cdot 10^6$ CD34+/kg de poids du receveur⁽⁷⁾.

c) Le sang de cordon

Utilisé essentiellement dans le cadre d'allogreffes non apparentées, le sang de cordon doit être sélectionné sur des critères de compatibilité HLA et de richesses cellulaires. Une dose minimum de $3 \cdot 10^7$ cellules nucléées/kg est nécessaire. En effet, des études menées par Wagner et al. ont observé un taux d'échec de greffe et une survie moins importante chez des patients pour qui moins de $1,7 \cdot 10^5$ CD34+/kg de poids du receveur ont été injectées⁽⁸⁾. D'autres études ont montré le bénéfice des greffes par double sang de cordon en termes de survie et de prise de greffe^{(9), (10)}. Chez des sujets atteints de leucémie aiguë, un traitement par conditionnement myéloablatif suivi d'une allogreffe de double sang de cordon serait associé à un taux de rechute moins important qu'une greffe géno ou phéno-identique ou encore une

greffe mismatch 9/10. La mortalité sans rechute (NRM) serait cependant plus élevée sans impacter la survie sans leucémie (LFS)^{(7),(11),(12),(13)}.

C. Indications cliniques

Si elle reste le meilleur moyen de prévenir la rechute, l'allogreffe reste néanmoins associée à une forte morbi-mortalité liées au traitement (TRM). Celle-ci est indiquée dans de nombreuses hémopathies malignes : les leucémies aiguës (LAM, LAL), les syndromes myélodysplasiques, les lymphomes, les myélomes et les myélofibroses (primitives ou secondaires). Les protocoles sont adaptés en fonction de la pathologie et de son pronostic, établis sur des critères cytogénétiques et moléculaires, ainsi que sur l'âge et les facteurs de risques du patient. Dans le cadre d'une LAM avec des critères cytogénétiques de bon pronostic ainsi que des critères moléculaires favorables (CEBPA doublement muté, NPM1+ FLT3-) avec une maladie résiduelle (MRD) négative, le risque de rechute est estimé suffisamment bas chez ces patients. Le taux de succès du rattrapage étant également élevé, l'allogreffe pourrait être reportée lors d'une seconde rémission⁽¹⁴⁾. Néanmoins, des méta-analyses plus récentes, sur plusieurs études randomisées ont montré une meilleure survie sans rechute (RFS) chez des patients allogreffés ou autogreffés versus chimiothérapie seule. Avec ces nouvelles recommandations, une autogreffe ou une allogreffe géno-identique pourra être proposée en première Rémission cytologique (RC1). D'autre part, les patients de mauvais pronostic seraient préférablement allogreffés en géno-identique, phéno-identique, ou en greffe alternative en RC1, l'autogreffe n'étant pas recommandée^{(7),(15)}. Le **tableau n° 1** résume les pratiques courantes en Europe d'après l'*EBMT*, en fonction des pathologies et des facteurs pronostiques de la maladie.

PATHOLOGIES	INDICATIONS
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	
Bon pronostic (<i>LAM-CBF t(8 ; 21), inv(16) t(16 ; 16), CEBPA doublement muté/ NPM1+/FLT3- MRD -</i>)	Autogreffe en RC1 ou allogreffe géno-identique
Pronostic intermédiaire	Allogreffe géno/phéno-identique ou alternatif Autogreffe++ si pas de donneur géno-identique
Mauvais pronostic (<i>faible répondeur, M5/M6, caryotype complexe/monosomie 7 Inv(3)/FLT3+</i>).	Allogreffe géno/phéno-identique et alternative Autogreffe non recommandée
LAM 3	En RC2, MRD -, autogreffe en consolidation
LAL	
<i>>35 ans, mauvais répondeur/ chimiorésistant MRD+ en RC1</i>	Allogreffe géno/phéno-identique
<i>Patients en rechute après chimio en RC2/MRD+</i>	Allogreffe géno/phéno-identique /greffe alternative
<i>LAL Ph+/- MRD-</i>	Autogreffe
Leucémie Myéloïde Chronique	
	Allogreffe si rechute après ITK de 2 ^{ème} génération ou résistance connue (mutation T315I)
Myélofibrose primitive ou Secondaire < 65 ans	
	Allogreffe géno/phéno identique ou greffe alternative Autogreffe non recommandée
Syndrome Myélodysplasique	
	Autogreffe en cas de facteur de bon pronostic Allogreffe si blastes < 5%
LYMPHOME	
	Autogreffe en 1 ^{ère} intention Allogreffe si rechute ou maladie réfractaire
MYELOME	
<i>< 70 ans répondant à une 1^{ère} ligne de traitement</i>	Autogreffe en conso
<i>>70 ans, patients réfractaire ou rechute précoce</i>	2 ^{ème} autogreffe +chimio Allogreffe en cours d'essais cliniques
APLASIE MEDULLAIRE	Allogreffe géno-identique, patients jeunes (survie à 80%)

Tableau 1: Indications des allogreffes et autogreffes d'après (7)

LAM: Leucémie Aiguë Myéloïde, LAL: Leucémie Aiguë Lymphoïde, MRD: Maladie Résiduelle,

RC1: première Rémission Cytologique, Ph+: chromosome de Philadelphie

D. Conditionnements

Le conditionnement préalable à l'allogreffe doit répondre à deux principaux objectifs : avoir un rôle immunosuppresseur et une action anti-tumorale. Différents schémas thérapeutiques sont possibles, se distinguant par leurs pouvoirs myélotoxiques et leurs propriétés immunomodulatrices. Il existe des conditionnements myéloablatifs (MAC) et des conditionnements atténués (RIC) ou non myéloablatifs⁽¹⁶⁾. Le choix du conditionnement se fera en fonction des caractéristiques générales du patient, notamment l'âge, les facteurs de comorbidité, la pathologie et son statut au diagnostic. Le nombre de lignes de traitement et la source de greffon qui sera utilisée seront définis d'après ces mêmes critères. Dans le cadre d'un conditionnement myéloablatif, une irradiation corporelle totale (ICT) à dose maximum de 12 Gray associée à de l'Endoxan® à une dose totale de 120mg/kg est utilisée. Dans certaines situations et pour certaines pathologies, l'ICT est substituée par du Busulfan®, toujours associée à de l'Endoxan® ou de la fludarabine. Dans le contexte d'une chimiothérapie d'intensité réduite ou non myéloablatif, les mêmes molécules sont utilisées mais à dose réduite. La fludarabine est utilisée à dose plus faible associée à une ICT ne dépassant pas les 2 Gray, plus ou moins associée à une injection de sérum anti-lymphocytaire (SAL). D'autres molécules comme le Melphalan® peuvent être aussi utilisées. Le problème majeur attaché à ce type de conditionnement est un effet cytoréducteur moindre, augmentant le risque de rechute. La toxicité liée au traitement demeure néanmoins plus faible (TRM)⁽¹⁷⁾.

E. Complications de l'allogreffe

a) La GVH

La GVH constitue une des complications majeures de l'allogreffe en termes de morbidité et de mortalité, responsable de 30% de décès des patients et jusqu'à 80-90% de décès pour les formes plus sévères. Elle résulte d'un conflit immunitaire avec les cellules du greffon qui reconnaissent comme étrangers les antigènes tissulaires du receveur. Les tissus concernés sont principalement l'épithélium cutané et digestif mais le foie et le thymus peuvent également être touchés. L'intensité du conditionnement, l'âge du receveur, le statut CMV, la compatibilité HLA (donneur apparenté, non apparenté, greffe alternative), et la présence d'antigènes

mineurs (notamment dans les schémas « femme donneuse et homme receveur », lié à la présence d'antigènes mineurs HY sur le chromosome Y) sont les principaux facteurs favorisant une GVH^{(18),(19)}.

1. GVH aiguë

La GVH aiguë, dont l'incidence varie de 20 à 60% survient classiquement au cours des cent premiers jours post allogreffe⁽²⁰⁾. Les organes principalement atteints sont la peau avec la présence d'un rash cutanéomuqueux, le foie et le tractus gastro-intestinal. Ces atteintes se traduisent biologiquement par une hyper-bilirubinémie et cliniquement par des nausées, vomissements et diarrhées. La GVH aiguë peut survenir également après les cents premiers jours, il s'agit d'une GVH aiguë retardée. La différence avec la GVH chronique est basée sur des critères cliniques définis par des conférences de consensus de la NIH⁽²¹⁾. Les nouveaux critères de diagnostics cliniques de GVH chronique sont en effet basés, entre autres, sur des atteintes de la bouche, des yeux, du tractus génital, des poumons et des articulations. Les réactions de GVH aiguë se déroulent en plusieurs étapes ; une étape de conditionnement aboutissant à des dommages tissulaires et une sécrétion de TNF α , IL-1 et IL-6 chez le receveur, une activation des lymphocytes T du donneur par augmentation de la présentation d'antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur puis une phase effectrice d'inflammation correspondant à un maintien de l'environnement inflammatoire^{(22),(23),(24)}. Tout ceci a pour conséquence une destruction des cellules tumorales et des cellules de l'hôte. Les **tableaux n°2 et 3** résument les stades et les différents grades en fonction des organes atteints⁽²⁵⁾.

Peau	Signes
Stade 0	Pas d'atteinte
Stade 1	<25% de la surface corporelle totale 25 à 50% de la surface corporelle totale >50% de la surface corporelle totale (+ érythrodermie)
Stade 2	
Stade 3	
Stade 4	Erythème bulleux généralisé+ desquamation >5% de la surface corporelle totale
Foie	Bilirubine conjuguée
Stade 0	< 2mg/dl
Stade 1	2-3mg/dl
Stade 2	3,1-6 mg/dl
Stade 3	6,1-15 mg/dl
Stade 4	>15 mg/dl
Atteinte Gastro-intestinale	Volume de selles perdus/24h chez adulte >50kg
Stade 0	< 500ml/24h
Stade 1	500-1000 ml/24h
Stade 2	1000 -1500 ml/24h
Stade 3	>1500 ml/24h
Stade 4	Douleurs abdominales + selles abondantes

Tableau 2: Différents stades de la GVH aiguë en fonction des 3 principaux organes atteints d'après ^{(25), (26)}.

Grade	Peau	Foie	Atteinte gastro-intestinale
Grade I	Stade 1 à 2	Non	Non
Grade II	Stade 3	Stade 1	Et/ou stade 1
Grade III	Stade 2 à 3	Stade 2-3	Et/ou stade 2-3
Grade IV	Stade 2 à 4	Stade 4	Et/ou stade 4

Tableau 3: Différents grades en fonction des atteintes des 3 principaux organes lors d'une GVH aiguë d'après ^{(25), (26)et (27)}.

2. GVH chronique

La physiopathologie de la GVH chronique est quant à elle assez mal connue. L'implication des cellules T CD4+ du donneur suivie d'une activation de la voie TH2 (réponse humorale) et d'une formation de T CD4+ alloréactifs serait mis en évidence^{(28), (29)}. Il y aurait également une augmentation de la réponse des lymphocyte Th1 et Th17 parallèlement à une diminution des lymphocytes T régulateurs⁽³⁰⁾. D'autres études suggèrent que le risque de développement de GVH chronique est probablement associé à un polymorphisme génétique donneur-receveur, une déficience en cellules immunitaires tels que les cellules NK, les cellules T régulatrices et une augmentation des molécules inflammatoires TNF α , IL10 et BAFF à l'origine d'une formation de fibrose inflammatoire. Ces molécules inflammatoires pourraient de ce fait servir de marqueurs de survenue de GVH chronique^{(31),(32)}. L'incidence est de 30% chez les receveurs qui ont reçu une greffe géno-identique 10/10 et de 60 à 70 % chez les receveurs ayant bénéficié d'une greffe alternative ou phéno-identique non apparentée^{(25),(33)}. Historiquement, on parlait de GVH chronique lorsque celle-ci survenait après cent jours post allogreffe. Il est devenu évident que cette notion seule n'avait que peu de sens au niveau clinique. En 2005, la NIH a proposé une conférence de consensus se basant sur des manifestations cliniques plutôt que sur un laps de temps de survenue des signes cliniques^{(21), (34),(35)}. Il est reconnu que des signes de GVH aiguë et chronique peuvent coexister chez un même patient.

3. Prophylaxie de la GVH

Une prophylaxie par traitements immunosuppresseurs est mise en place pour prévenir la GVH. Le traitement classique va comprendre de la ciclosporine à dose de 3 à 5 mg/kg/jour en IV avec un relais par voie orale dès que possible, associée à quatre doses de Méthotrexate® à J+1, J+3, J+6, J+11⁽³⁶⁾. Cette association peut être complétée par une injection de sérum anti-lymphocytaire (SAL) dans le but d'effectuer une déplétion *in-vivo* en cellules T. Le Méthotrexate® peut également être substitué par du Cellcept® (mycophénolate mofétil)^{(37),(38),(39)}. D'autres molécules comme les anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs solubles à l'interleukine 2 (anti-IL2), ou des anti-TNF α peuvent être utilisées.

b) Le rejet et la rechute

Le risque de rejet et de rechute reste rare mais présent. Ces complications sont souvent liées à une incompatibilité HLA, la présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur dirigé contre le donneur, l'utilisation d'un conditionnement non myéloablatif (RIC)⁽⁴⁰⁾, un greffon contenant un taux de CD34+ insuffisant, une déplétion trop importante en cellules T réduisant l'effet GVL^{(41),(42)} ainsi que les infections virales intercurrentes telles que celles à cytomégalovirus (CMV). La pathologie et son statut au moment de la greffe sont également des facteurs influençant la rechute⁽¹⁷⁾.

c) Les complications infectieuses

Elles sont fréquentes et à l'origine d'une lourde morbidité. Plusieurs mécanismes entrent en jeu et vont avoir une influence variable au cours du temps : l'aplasie médullaire, faisant suite au conditionnement et la neutropénie qui en résulte sont responsables des complications du premier mois. L'asplénie fonctionnelle, secondaire à l'irradiation corporelle totale, favorise les infections à germes encapsulés et celles dues aux virus (EBV, CMV). L'immunosuppression cellulaire induite par la prophylaxie de la GVH s'exprime à partir du deuxième mois post allogreffe et peut être à l'origine d'infections à pathogènes intracellulaires. Le risque fongique est particulièrement important en cas de corticothérapie prolongée. Le risque infectieux va également dépendre de la pathologie, de la source du greffon (prévalence deux à trois fois supérieure pour les allogreffes non apparentées), de la neutropénie prolongée dans le cadre des greffes de sang placentaire, de la richesse en lymphocytes T et des modalités du conditionnement (neutropénie atténuée en cas de conditionnement à intensité réduite)⁽¹⁷⁾. La **figure 4** représente la chronologie des complications infectieuses en fonction du temps post greffe.

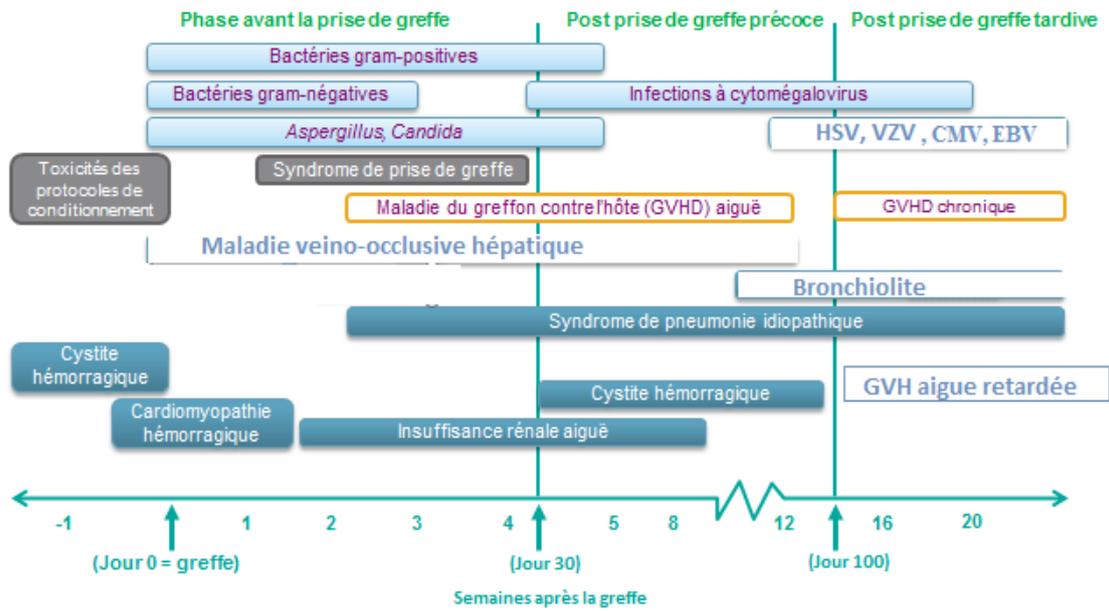


Figure 4: Chronologie des complications de la greffe de cellules souches hématopoïétiques ⁽²⁵⁾

d) Autres complications non immunologiques

En dehors des complications infectieuses, la réalisation d'une greffe allogénique induit chez le receveur des complications liées à la toxicité propre à la procédure. On note en effet des atteintes rénales liées à la néphrotoxicité de certaines molécules de chimiothérapie et de certains antibiotiques, des complications hépatiques par survenue de maladies veino-occlusives (MVO) liées à l'utilisation de toxiques ou à une réactivation virale. Il existe également un risque de développement de fibrose pulmonaire et de perturbations endocriniennes.

IV. Les cellules NK

A. Définition

Les cellules NK ont été décrites dans les années 70 par R. Kiessling et R. Herbman comme étant des lymphocytes non T et non B ayant une cytotoxicité naturelle vis-à-vis des cellules tumorales. Ils sont en effet décrits comme étant de grands lymphocytes granulaires présents dans le sang périphérique dont le phénotype est caractérisé par l'expression des marqueurs CD56 (NCAM), CD16 (FcγRIIIA), NKp46 et par l'absence d'expression de CD3, ce qui va

les différencier phénotypiquement des autres lymphocytes. Ces cellules constituent environ 10 à 15% des lymphocytes circulants dans le sang périphérique humain mais sont également présentes dans la rate, le foie, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, la cavité péritonéale et le placenta. Elles peuvent subir une activation par des cytokines et sont capables d'extravaser et d'infiltrer la majorité des tissus contenant des cellules infectées ou malignes⁽⁴³⁾. Ces cellules sont considérées comme faisant partie de l'immunité innée, principalement en raison de l'absence d'expression des récepteurs spécifiques d'antigènes à leur surface et par leur absence de nécessité d'être stimulé au préalable avant d'effectuer leurs fonctions. Elles constituent ainsi une première ligne et assurent un rôle important dans l'immuno-surveillance contre les infections virales et les processus tumoraux. Il a été démontré que les cellules NK jouent également un rôle dans l'immunité adaptative en possédant un comportement de mémoire. Elles ont la capacité de conserver *in vivo* la mémoire intrinsèque d'une activation préalable *in vitro* par interaction avec d'autres cellules de l'immunité telles que les cellules dendritiques^{(44),(45)}. Leurs rôles font actuellement l'objet de différents travaux de développement clinique dans le domaine thérapeutique^{(46),(47)}.

B. Développement, phénotype et fonction

Les cellules NK dérivent de cellules souches hématopoïétiques CD34+ et commencent leur développement dans la moelle osseuse mais, contrairement aux lymphocytes T, leur maturation s'opère au niveau des organes lymphoïdes secondaires, sans passage obligatoire par le thymus⁽³⁾. Certaines cytokines (surtout les interleukines 2, 18, et 15) ont un rôle majeur dans la maturation et la différenciation des cellules NK⁽⁴⁵⁾. Un modèle de développement et de différenciation des cellules NK a été proposé par Freud et Caligiuri⁽⁴⁸⁾ (**figure 5**). Il comporte cinq stades majeurs de différenciation basés sur l'étude de l'expression des molécules telles que CD34, CD11, CD94, CD16 et CD56 majoritairement. Les stades 4 et 5 sont marqués par l'acquisition de CD56 et correspondent aux deux principaux groupes de cellules NK, les CD56^{bright} et les CD56^{dim}. L'acquisition de fonctions effectrices telles que la production d'IFN γ et la cytotoxicité s'effectuent tardivement au cours de leur développement (stades 4 et 5).

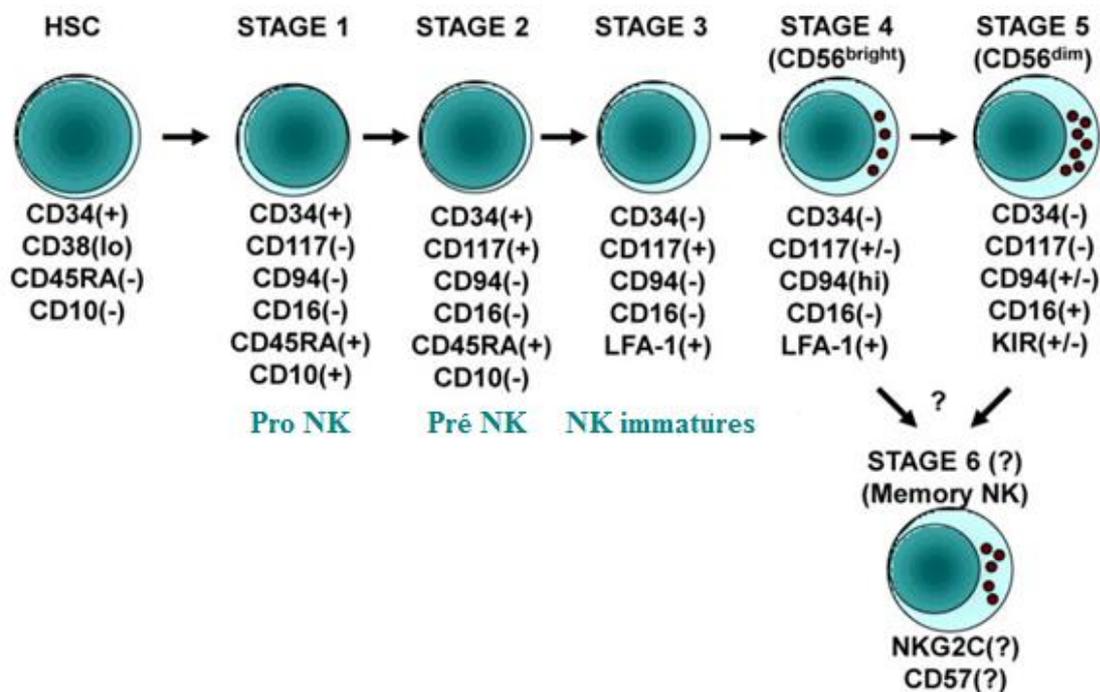


Figure 5: Modèle de développement in vivo des différents stades des cellules NK humaines ⁽⁴⁸⁾

Les CD56^{dim}CD16⁺ constituent la vaste majorité des cellules NK au niveau sanguin (90-95%), elles sont majoritairement cytotoxiques mais peuvent également produire de façon significative de l'IFN γ et du TNF α après stimulation par une cible antigénique. L'expression du récepteur Fc γ RIII CD16 assure la capacité des cellules NK à favoriser la cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC).

Les CD56^{bright} CD16^{LOW/-} sont majoritairement retrouvées au niveau du système lymphatique mais constituent néanmoins 10 % des cellules NK au niveau sanguin. Elles contiennent des vésicules cytolitiques de perforine et de granzyme et sont capables de produire des cytokines en réponse à une inflammation^{(49),(50)}. En plus d'une régulation de la fonction des cellules NK liée à la production de cytokines, il existe une régulation du signal associée à la présence de récepteurs inhibiteurs et activateurs situés à leurs surfaces permettant ainsi la distinction entre cellules normales et anormales. La **figure 6** résume les principales différences phénotypiques entre les deux types cellulaires.

La principale fonction des cellules NK est donc la cytotoxicité. Il s'agit d'une cytotoxicité dépendante de la perforine, mécanisme similaire à celui utilisé par les lymphocytes T CD8+. Suite à la reconnaissance d'une cellule cible, la cellule NK libère le contenu de ces granules cytoplasmiques et entraîne la formation de pores dans la membrane de la cellule cible. D'autres mécanismes cytotoxiques conduisant à la mort cellulaire sont possibles notamment une interaction Fas/ Fas ligand, ou encore une libération de granzyme B (serine estérase des granules). L'autre fonction des cellules NK est la production de cytokines, notamment l'INF γ , mais aussi l'IL-10 le GM-CSF et les β -chimiokines. Ces cytokines produites participent à l'activation, à l'entretien de la réaction inflammatoire, au contrôle du type de réponse adaptative et au contrôle direct de la réplication virale. ^{(46),(47),(51)}.

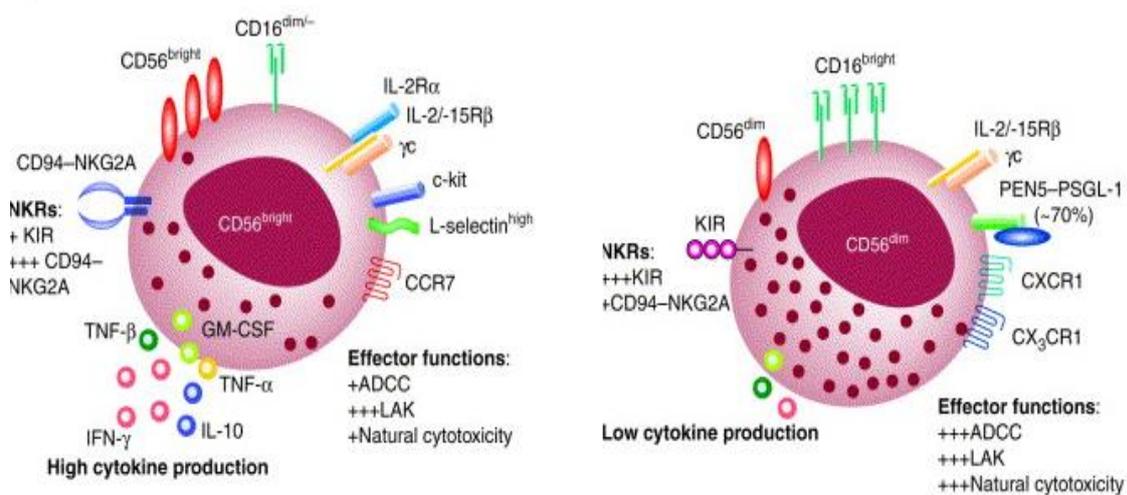


Figure 6: Phénotypes et fonctions des cellules NK ⁽⁵¹⁾

C. Education des cellules NK et tolérance du soi

Les cellules NK acquièrent des fonctionnalités par le biais d'un processus d'« éducation » aussi appelé « licensing », qui va leur permettre de distinguer les cellules saines des cellules anormales qui seront leurs cibles^{(52),(53)}. Grâce à la présence d'un large panel de récepteurs à la surface cellulaire, en situation physiologique, les cellules NK interagissent avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) sur les cellules saines et sont inhibées. Ce mécanisme garantit que les cellules saines soient préservées de la cytotoxicité NK. Une baisse d'expression des molécules CMH-I est perçue comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs, et conduit à l'activation des fonctions effectrices des cellules NK (par absence de signal inhibiteur). De plus les cellules NK lysent les cellules cibles qui n'expriment pas les molécules CMH-I, c'est la théorie du soi manquant « missing self »⁽⁵⁴⁾. Ceci va constituer un élément important dans l'immunité anti-tumorale que vont exercer les cellules NK vis-à-vis des blastes dans les leucémies aiguës, de par leur perte d'expression du CMH de classe I à la surface cellulaire⁽⁴⁹⁾. D'autre part, grâce à la présence de récepteurs dits activateurs, les cellules NK reconnaîtront les molécules de « détresse » sur les cellules anormales (**figure 7**). Même si l'expression des molécules du CMH-I est normale, l'apparition ou la surexpression de ces ligands (cellules infectées ou tumorales) modifie l'équilibre des signaux des récepteurs activateurs et inhibiteurs, et conduit à l'activation des cellules NK⁽⁵⁵⁾.

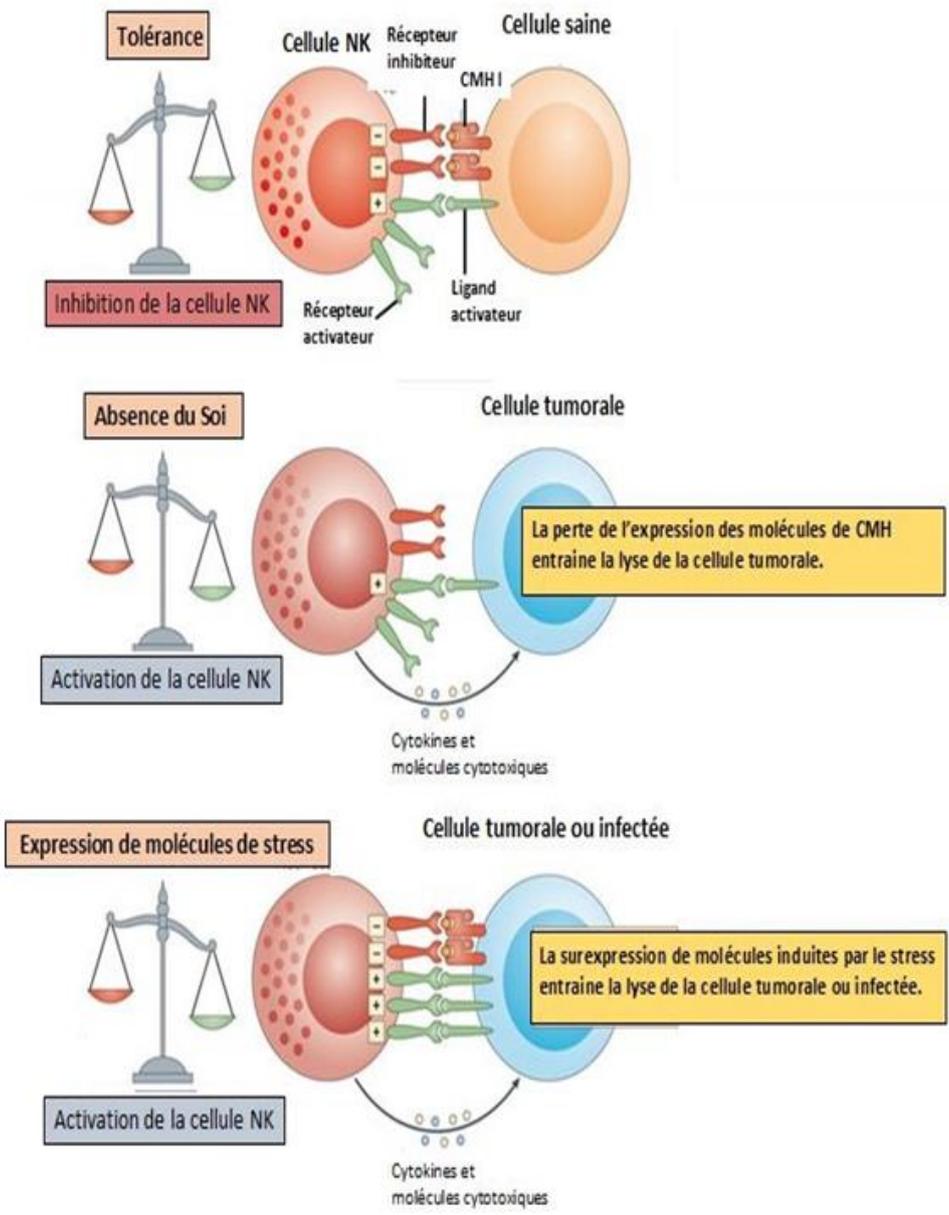


Figure 7: Mécanismes d'activation et d'inhibition des cellules NK^{(53),(54)}

D. Répertoire des cellules NK

Les cellules NK ont donc la particularité de pouvoir éliminer rapidement les cellules cibles, infectées ou anormales. Ce mécanisme dépend de l'expression de plusieurs récepteurs sur leurs surfaces qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I. Ces récepteurs appartiennent à différentes familles:

- les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines incluant les Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) et les Leukocytes Immunoglobulin-like Receptor (LIR)
- les récepteurs hétérodimères CD94/NKG2 appartenant à la famille de récepteurs lectines de type C
- la famille des récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCR).

L'activité des cellules NK est régulée par l'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs de ces récepteurs. La résultante de ces signaux conditionne la réponse NK⁽⁵⁶⁾.

a) Les récepteurs KIR et leurs ligands

Les récepteurs KIR sont des glycoprotéines transmembranaires codées par des gènes regroupés au niveau du chromosome 19 et reconnaissant les molécules du CMH de classe I classique (notamment HLA-C) et non classique (notamment HLA-G). On distingue deux sous-familles en fonction du nombre de domaines extracellulaires : les KIR2D (deux domaines extracellulaires) et les KIR3D (trois domaines extracellulaires). Les récepteurs KIR diffèrent aussi par la longueur de leur domaine cytoplasmique, caractérisant ainsi les KIR inhibiteurs (domaine intracellulaire long) et les KIR activateurs (domaine intracellulaire court). Ces derniers ont pour rôle d'assurer l'interaction des cellules NK avec les cellules normales tout en leur permettant de reconnaître des cellules ayant une expression altérée du CMH I suite à une transformation tumorale ou une infection virale^{(57),(58),(59)}.

b) Les récepteurs NCR et leurs ligands

La famille des récepteurs NCRs est composée de 3 récepteurs activateurs: NKp46, NKp44 et NKp30. Ces récepteurs partagent beaucoup de similitudes quant à leurs fonctions et sont capables de reconnaître une variété importante de ligands dont le nombre ne cesse de croître,

notamment les ligands B7H6 pour NKP30 et MLL5 pour NKp44, exprimés par les cellules tumorales. D'autres ligands reconnus par ces récepteurs sont également exprimés par les cellules infectées par des virus. Les NCRs ont la capacité d'activer les cellules NK et surtout d'induire la lyse directe par cytotoxicité des cellules cibles lors de l'interaction avec leurs ligands. NKp46 et NKp30 sont exprimés par les cellules NK au repos alors que l'expression de NKp44 est exclusivement induite sur les cellules NK activées. Les récepteurs NCRs constituent donc une arme très importante qu'utilisent les cellules NK pour éliminer les cellules infectées ou bien transformées par un processus tumoral. La diminution de l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules NK est un mécanisme d'échappement de certains virus^{(59),(60)}.

c) Les récepteurs CD94 /NKG2A, B et C

Les récepteurs CD94/NKG2 sont des protéines appartenant à la famille des lectines de type C. Ils sont exprimés à la surface des cellules NK humaines sous la forme d'hétérodimères et sont composés d'une sous-unité commune, le CD94, liée de façon covalente (pont disulfure) à une autre sous-unité de la famille NKG2. Les complexes CD94/NKG2A, B et C reconnaissent la molécule du CMH-I non classique HLA-E. Cette dernière présente des peptides dérivés de séquences signal des molécules du CMH-I classique. Les hétérodimères CD94/NKG2A et CD94/NKG2B sont inhibiteurs tandis que l'hétérodimère CD94/NKG2C est un récepteur activateur^{(59),(61)}. Les récepteurs à domaine intracellulaire long contiennent deux motifs ITIM qui délivrent un signal inhibiteur et les récepteurs à domaine intracellulaire court délivrent un signal activateur en s'associant avec la protéine adaptatrice DAP-12 qui possède un motif ITAM (figure 8).

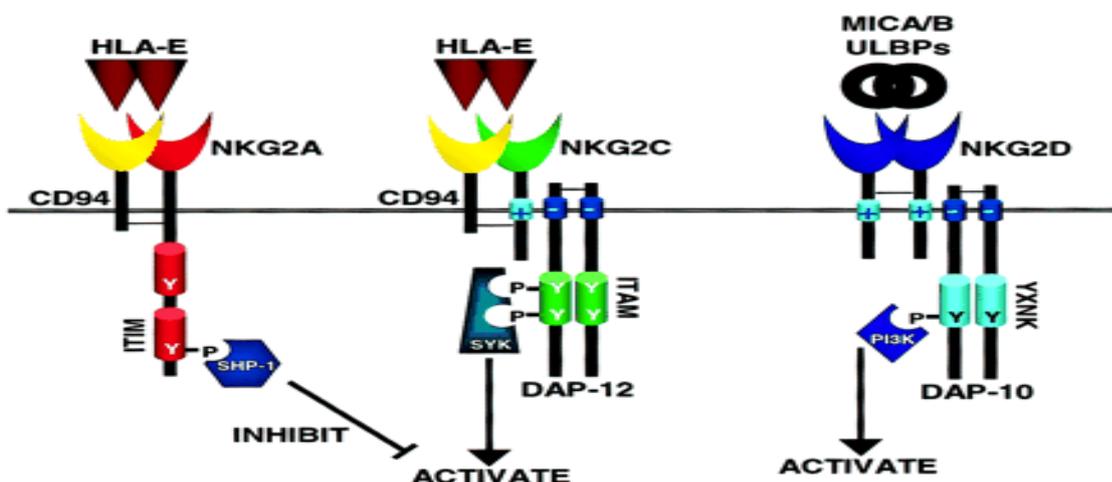


Figure 8: Voie de signalisation des différents récepteurs NKG2⁽⁴⁴⁾

d) Le récepteur NKG2D et ses ligands

Identifié en 1991 comme un récepteur orphelin activateur des cellules NK ne co-exprimant pas CD94 contrairement aux autres récepteurs NKG2, NKG2D est présent sous forme d'un récepteur homodimère et fait néanmoins partie de la famille des récepteurs semblables aux lectines de types C⁽⁶²⁾. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules NK, mais également des lymphocytes TCD8+ $\alpha\beta$, $\gamma\delta$ ainsi que des macrophages⁽⁶³⁾. Le gène codant NKG2D est situé sur le chromosome 12 au niveau du gène NKC.

E. Le récepteur NKG2D

a) Signalisation

Le récepteur NKG2D est associé à une molécule adaptatrice DAP10 permettant la formation d'un complexe nécessaire à la stabilisation et à l'activité de NKG2D à la surface cellulaire (**figure 8, 9**). Chaque homodimère de NKG2D s'associe avec deux homodimères de DAP-10 pour former une structure hexamérique. Sur les lymphocytes TCD8+, NKG2D servira de molécule de co-stimulation pour amplifier le signal du récepteur TCR (T Cell Receptor)⁽⁶⁴⁾.

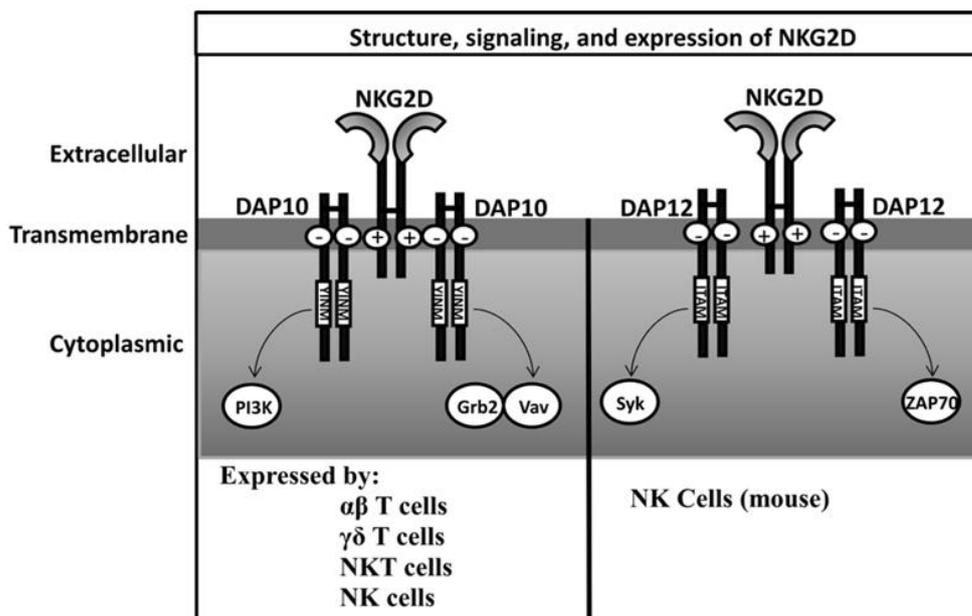


Figure 9: Association du récepteur NKG2D, des molécules adaptatrices DAP10 et leurs expressions par les leucocytes et les cellules NK (modèle murin)⁽⁶²⁾

b) Régulation du récepteur NKG2D

De nombreux facteurs régulent l'expression de NKG2D à la surface cellulaire : la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-2, 7, 12 et 15 qui vont augmenter l'expression membranaire du récepteur ainsi que la production de ligands spécifiques permettant leur activation⁽⁶⁵⁾. Certains virus et cellules tumorales ont développé plusieurs stratégies d'échappement à son action en sécrétant notamment des facteurs solubles (Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ou Prostaglandine E2 (PGE2)) ayant la capacité de moduler l'expression de NKG2D⁽⁵⁷⁾.

c) Polymorphisme du récepteur NKG2D

Il existe une relation inversement proportionnelle entre activité cytotoxique des cellules NK et développement de cancer. En effet, une étude menée par Hayashi et al., permettant d'évaluer les facteurs génétiques associés à une activité cytotoxique, a permis de souligner qu'il était possible d'étudier des haplotypes de NKG2D afin de mettre en évidence les personnes présentant une haute ou une faible activité cytotoxique, ce qui par extension, permettrait également de mettre en évidence un risque plus ou moins élevé de développement de cancer en fonction de cette activité. Il a donc été mis en évidence deux blocs d'haplotypes, chacun d'entre eux contenant deux groupes majeurs de SNPs reliés soit à une basse (LNK1/LNK2) soit à une haute (HNK1/HNK2) activité cytotoxique. Les SNPs reliés à ces haplotypes majeurs se situent majoritairement au niveau du locus de NKG2D, au sein d'une région du gène NKC, s'étendant sur 270 kb et comprenant des loci de gènes de récepteurs de cellules NK. Huit polymorphismes ont été associés de manière significative à une activité cytotoxique. Il s'agit notamment de NKC-3 (rs1049174) et NKC-4 (rs2255336) mais également de NKC 7, 9, 10, 11, 12, 17. Le **tableau n° 4** résume la relation entre les différents génotypes possibles et l'activité cytotoxique⁽⁶⁶⁾.

	Génotype	Activité cytotoxique
NKC3		
<i>HNK1 (G)</i>	G/G	Forte
	G/C	Intermédiaire
<i>LNK1 (C)</i>	C/C	Basse
NKC4		
<i>HNK2 (T)</i>	T/T	Forte
	C/T	Intermédiaire
<i>LNK2 (C)</i>	C/C	Basse

Tableau 4: Activité cytotoxique en fonction des polymorphismes NKC3 et NKC4 d'après ⁽⁶⁶⁾

d) MIC-A, exemple d'un ligand du récepteur NKG2D

Deux familles de ligands apparentés au CMH de classe I sont reconnues par NKG2D : l'UL-16-binding proteins (ULBP1-6) connu également sous le nom de RAET1 et le MHC classe I chain related protein (MIC-A et B). MIC-A et MIC-B sont situés sur le chromosome 6 à proximité du gène codant pour les molécules de CMH de classe I classique (**figure 10**). Ces molécules sont très polymorphes (il existe plus de 70 allèles connus de MIC-A et 30 allèles de MIC-B) et ne jouent aucun rôle dans la présentation d'antigène (il ne partage que 15 à 40% d'acides aminés avec le CMH de classe I)⁽⁶⁴⁾. A la différence du CMH-I classique, MIC-A et MIC-B sont des protéines très peu exprimées dans les tissus normaux. Une expression majoritaire au niveau de l'épithélium gastro-intestinal est retrouvée⁽⁶⁷⁾. Leur expression est par contre accrue dans les cellules soumises à un stress (cellules infectées et cellules tumorales)^{(68),(69),(70)}. Le gène MIC-A est associé étroitement avec le gène HLA-B par un phénomène de déséquilibre de liaison^{(71),(72),(73)}.

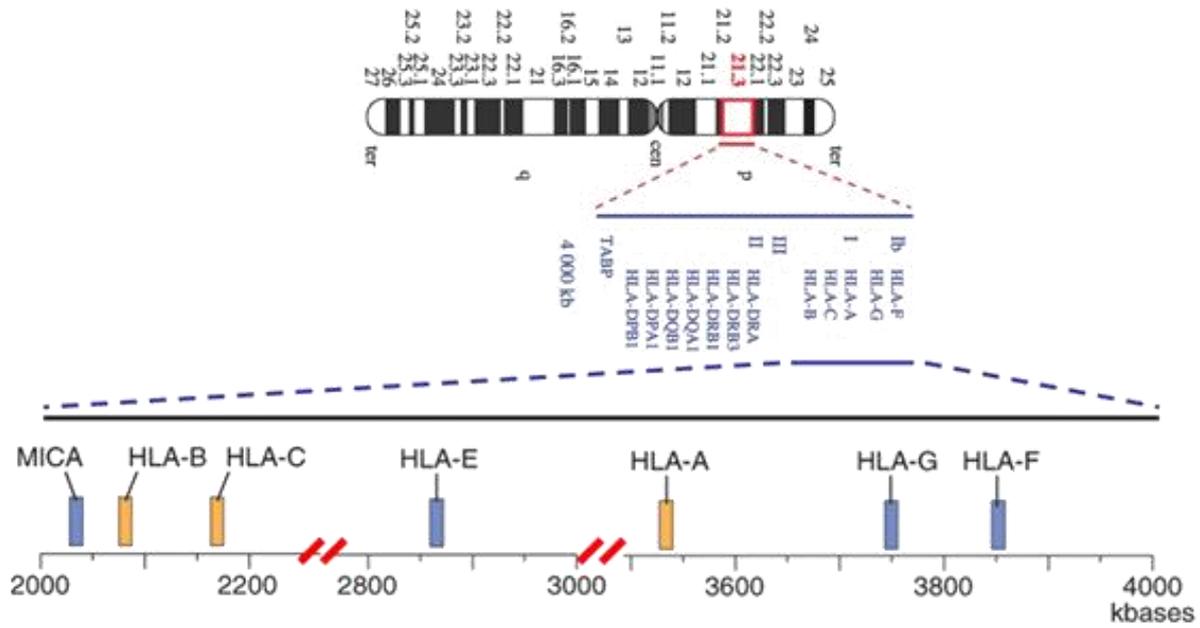


Figure 10: Localisation du gène MIC-A sur le chromosome 6⁽⁷³⁾

La protéine MIC-A est constituée de trois domaines extracellulaires (α 1-3), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique⁽⁶²⁾. Il s'agit d'une molécule constituée de six exons très polymorphes (figure 11)^{(74),(75),(76)}.

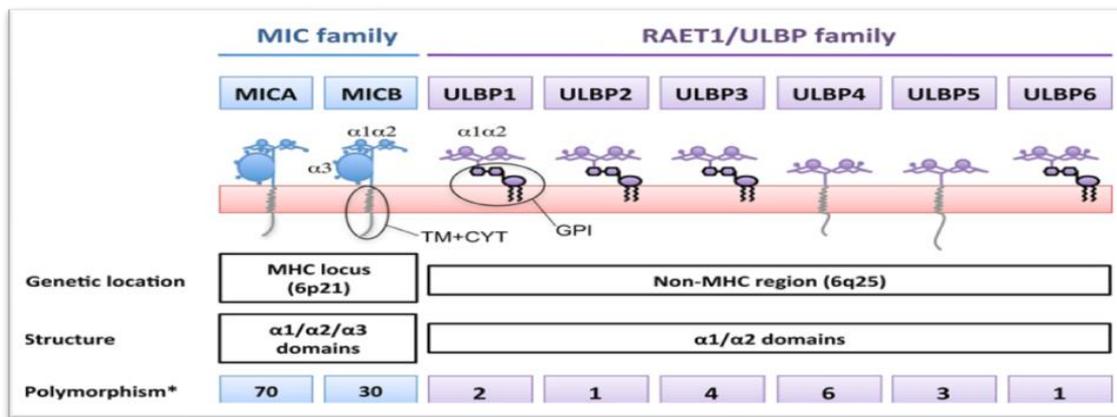


Figure 11: Structure et polymorphisme des ligands du récepteur NKG2D⁽⁷⁶⁾

1. MIC-A A5.1

L'exon 5 du gène MIC-A correspond à une séquence répétée de triplets de nucléotides « GCT ». Sept séquences différentes de répétitions sont décrites actuellement. Il s'agit des séquences A4 à A10, correspondant respectivement à une répétition de 4 à 10 triplets « GCT », A4 étant la séquence Wild-Type (WT). Ces séquences codent pour la partie transmembranaire de la protéine MIC-A⁽⁷⁷⁾. La mutation MICA A5.1 correspond à une modification d'un microsatellite sur l'exon 5. Une guanine est insérée, entraînant des modifications dans la traduction de la protéine (**Figure 12**). En effet, cette insertion introduit un codon STOP aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée par absence de queue cytoplasmique⁽⁷⁸⁾ (**figure 13**). La mutation A5.1 est liée à l'allèle commun MICA 008 (à plus de 90% dans une étude sur une population slovaque)⁽⁷⁹⁾.

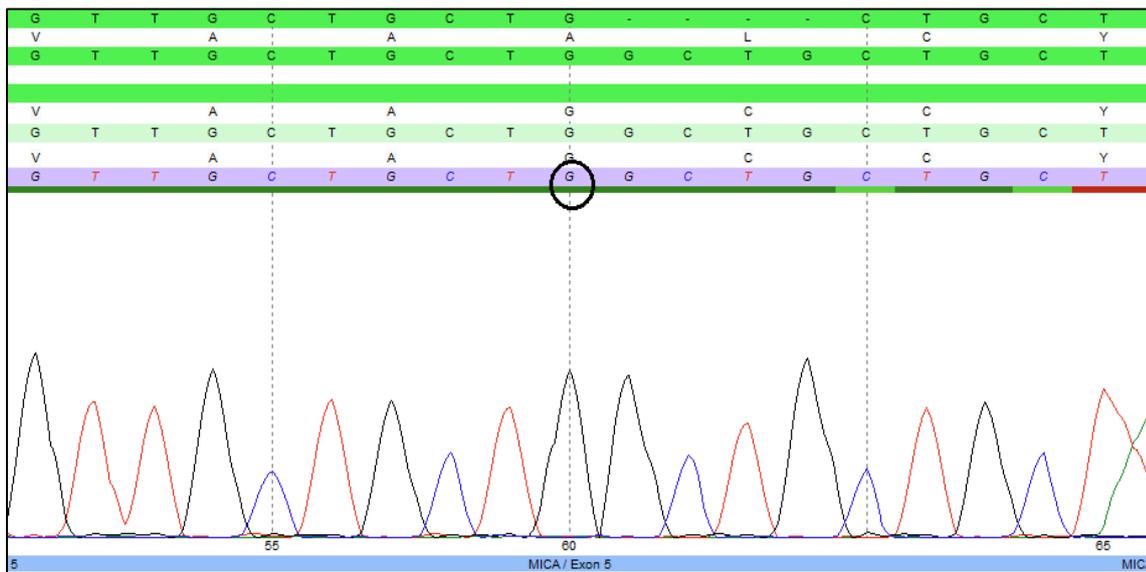


Figure 12: Séquence d'un allèle MICA A5.1, insertion d'un nucléotide G. (SeqPilot®)

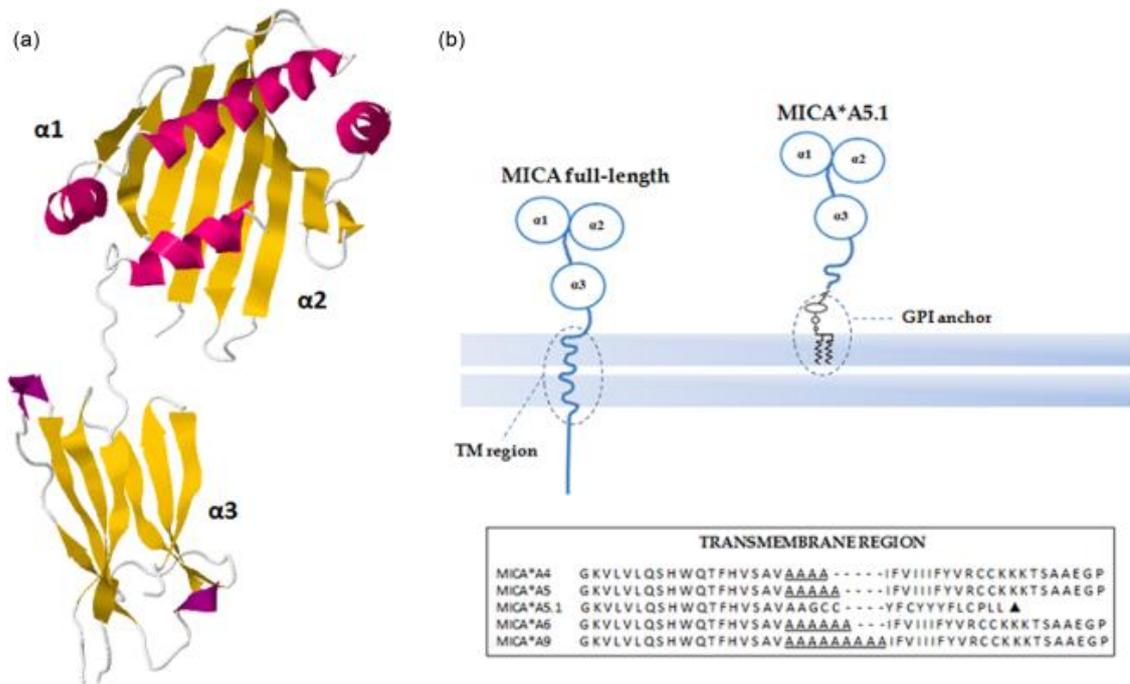


Figure 13: Structure de la molécule MIC-A sans et avec mutation A5.1⁽⁶⁸⁾

2. MIC-A 129

Le polymorphisme MIC-A 129 consiste en une substitution du nucléotide A en G en position 129 de l'exon 3 aboutissant à un nouvel acide aminé (Valine - Méthionine) au niveau de la chaîne lourde $\alpha 2$ de la protéine MIC-A. Cette substitution influe la liaison de MIC-A qui sera de forte affinité (en présence de méthionine) ou de faible affinité (en présence de valine) au récepteur NKG2D^{(80),(81)}.

3. MIC-A solubles

La molécule MIC-A peut exister sous forme soluble après clivage protéolytique de MIC-A au niveau membranaire. Cette forme soluble de MIC-A a une faible affinité pour les récepteurs NKG2D et entraînerait non seulement la production accrue d'IFN γ par les cellules NK mais stimulerait également une réponse TH2 plutôt que TH1, impliquant la survenue et le maintien d'une GVH chronique⁽⁸²⁾.

V.Objectifs de l'étude

L'efficacité des cellules NK a été initialement établie dans le cadre de greffes haplo-identiques, notamment sur une cohorte de 112 patients atteints de LAM⁽⁴²⁾. Ces patients présentaient donc un mis-match KIR-ligand classe I avec leurs donneurs, ce qui permettait de théoriser l'activité des cellules NK par un effet « missing-self ». Il a été observé une meilleure OS et une survie sans évènement (EFS) de 60% (comparé à un groupe contrôle sans mis-match KIR-ligand chez qui on avait un EFS de 5%). De plus, les infusions de $1,5 \cdot 10^7$ cellules NK/kg en greffe haplo-identique, (Miller et al.) mettent en évidence une réponse clinique sans GVH chez certains patients⁽⁴³⁾. D'autre part, des études préliminaires menées chez des souris NOD/SCID chez qui des blastes de LAM humains ont été transférés, ont montré qu'après transfusion de cellules NK, il a été observé une nette diminution de la blastose et donc un effet GVL important indépendant de la GVH. En effet, l'absence de signal inhibiteur entraînerait également une lyse des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur et donc une baisse de la GVH par diminution de la présentation d'antigène^{(3),(58),(83)}. L'impact clinique des cellules NK dans le cadre d'allogreffe sans mis-match HLA (géo ou phéno-identique) reste controversé et fait appel à d'autres mécanismes d'interactions cellulaires que le classique « missing-self », comme par exemple les interactions NCR/NCR ligands et NKG2D/MICA-ULBP⁽⁴⁹⁾.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au modèle NKG2D/MIC-A dans le cadre d'allogreffes sans mis-match HLA. L'objectif de notre étude est de définir l'impact des polymorphismes de ces deux gènes reliés à leur activité biologique, sur une cohorte de patients allogreffés en géno-ou phéno-identique.

Nous avons ciblé l'étude des polymorphismes MIC-A (MIC-A 129, A5.1) et NKG2D (NKC3, NKC4) et évalué leurs implications de manière dépendante ou indépendante, dans la survenue de GVH aiguë ou chronique et le devenir du receveur en termes de survie suite à l'allogreffe de CSH.

VI. Matériels et méthodes

A. Population étudiée : couples donneurs et receveurs

Il s'agit d'une étude rétrospective concernant 124 couples donneurs/receveurs. Les receveurs sont des patients atteints d'hémopathies malignes lymphoïdes ou myéloïdes ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH à partir de donneurs géno- ou phéno-identiques au CHU d'Amiens de 2011 à 2016 dans le service d'hématologie clinique.

a) Critères d'inclusion

Tous les critères cliniques des patients incluant l'âge, le sexe, la pathologie, le statut à la greffe et la prophylaxie utilisée suite à l'allogreffe dans l'étude sont répertoriés dans le **tableau n°5**.

b) Critères d'exclusion

Nous avons au départ 158 couples donneurs/receveurs.

Ont été exclus de l'étude : les patients ayant bénéficié d'une greffe alternative (haplotype ou mis-match 9/10), ceux n'ayant pu être suivis pour cause de décès précoce en post-allogreffe et ceux n'ayant pas la quantité requise d'ADN conservée au laboratoire d'histocompatibilité, afin de mener les investigations biologiques.

CARACTERISTIQUES	VALEURS
Receveur n= 124	
Age médian	54ans [21-72]
Homme	83
Femme	41
Statut CMV receveur-donneur	
Négatif-négatif	58
Autres combinaisons	66
Receveur-Sexe du donneur	
Homme-Femme	23
Autres combinaisons	101
Groupe sanguin ABO receveur-donneur	
Compatibilité ABO	79
Incompatibilité ABO	45
Conditionnement	
MAC+/- ICT	10
RTC	16
RIC/Séquentiel	98
Pathologies (Classification OMS 2008)	
LAM	41
AUTRES (LCDP, Leucémie à Plasmocytes, Leucémie Lymphoïde Chronique, aplasie médullaire, myélome, Lymphome de Hodgkin)	21
Lymphome non Hodgkinien	19
Syndromes myéloprolifératifs et LMMC	16
Leucémie Aiguë Lymphoïde	15
Syndrome Myélodysplasique	12
Statut à la greffe	
RP1, 2 ou +	21
RC 1	51
RC 2 ou +	18
Stable	12
Progression	22
Source cellulaire	
Moëlle Osseuse	12
Cellules Souches Périphériques	112
Source donneur	
Géno-identique	55
Phéno-identique	69
GVH prophylaxie	
Ciclosporine/méthotrexate	44
Ciclosporine/Cellcept®	32
Ciclosporine	42
Ciclosporine/méthotrexate/SAL	5
Ciclosporine/SAL	1

Tableau 5: Caractéristiques cliniques de la population étudiée

MAC= Conditionnement myéloablatif, RTC= Conditionnement de toxicité réduite, RIC= Conditionnement d'intensité réduite, ICT= Irradiation corporelle Totale, RP= Rémission Partielle, RC= Rémission Cytologique, LCDP= Leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes

B. Méthodes

Deux méthodes ont été appliquées :

- Séquençage selon la méthode SANGER pour la recherche de la mutation A5.1 du gène MIC-A, le polymorphisme MIC-A 129 ainsi que la détermination du génotypage du gène MIC-A.

- PCR en temps réel pour la recherche du polymorphisme NKC3 et NKC4 du récepteur NKG2D.

a) Extraction de L'ADN

L'extraction a été effectuée par méthode automatisée sur le GéoM-6®. La concentration et la pureté en ADN obtenue a été mesurée par spectrophotométrie sur Nanodrop®. L'ADN a ensuite été conservé à -20°C (ou -80°C pour les échantillons les plus anciens).

b) Génotypage MIC-A par la méthode Sanger

1. Principe

La méthode de séquençage Sanger est une technique gold standard créée par Frederick Sanger dans les années 1970. La méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire du fragment d'ADN d'intérêt.

L'élongation par l'ADN polymérase est réalisée en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ainsi que de faibles concentrations des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) chacun associé à des marqueurs fluorescents différents les uns des autres.

Leur incorporation sur le brin naissant entraîne, par effet terminateur de chaîne, un arrêt de la synthèse d'ADN. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de taille variable qui se terminent par toutes les positions possibles dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés selon leur taille. On obtient ainsi un électrophorégramme analysé informatiquement (**Figure 14**).

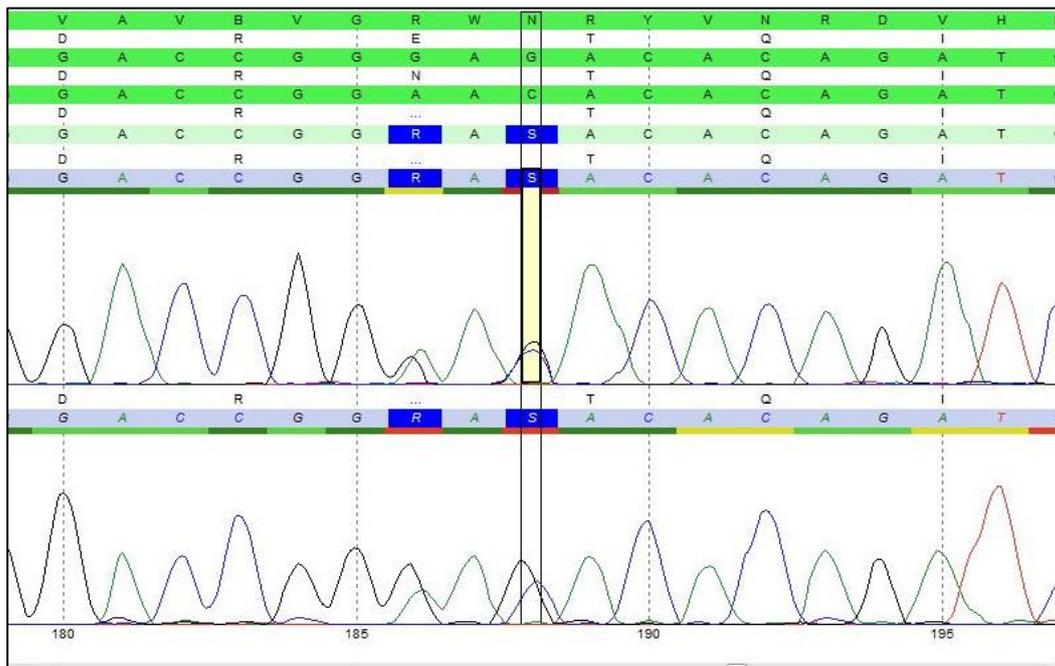


Figure 14: Principe du séquençage de Sanger, électrophorégramme à interpréter sur le logiciel SeqPilot®

2. Réactifs utilisés et choix des amorces

Nous avons utilisé un kit HotStarTaq Polymerase de QIAGEN® contenant de la HotStarTaq DNA Polymerase, activée après une incubation de 15min à 95°C, du tampon 10X permettant de maintenir une amplification spécifique et une bonne liaison des *primers*, du Mg^{2+} , cofacteur de la DNA polymérase et de la solution Q facilitant l'amplification par amélioration de la structure tridimensionnelle des molécules d'ADN, ainsi qu'un kit dNTP de QIAGEN® contenant 10mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, pour la réaction d'extension.

Le séquençage Sanger a été utilisé afin de déterminer la mutation au niveau de l'exon 5 et d'effectuer un génotypage du gène MIC-A. Les amorces devaient donc couvrir toutes les régions d'intérêts. Celles-ci ont été entièrement conçues en respectant les règles de longueurs de paires de bases (environ 20 pb), la température de fusion qui doit avoisiner les 60°C ainsi que le pourcentage de nucléotides GC qui ne doit pas excéder 60%. D'autres règles de « design » ont été consultées et respectées afin d'éviter l'hybridation des amorces entre elles ou la formation de boucles à l'intérieur ou à l'extérieur des segments d'amorces, qui pourraient également s'hybrider entre eux, augmentant par conséquent le risque d'échecs d'amplifications (<http://www.premierbiosoft.com>, <http://alhomepage.com>). Trois couples d'amorces (sens et anti-sens) ont ainsi été utilisés pour l'étude (Tableau n°6).

	Primers 5'→3'	Longueur (bp)	Tm (°C)	%GC
Exon 2F	ATTCCTGCCCCAGGAAG	18	58.45	56
Exon 2R	GAGACAGGTCCCTGCTCTCTG	21	59.97	62
Exon 3F	TTCGGGAATGGAGAAGTCACT	21	59.51	48
Exon 3R	ATGCCTTCATCCATAGCACAG	21	58.61	48
Exon 5F	AACACAGCGGGAATCACAG	19	59.7	52.6
Exon 5R	ATGGAAGCCTTGTCACCAAC	20	60	50

Tableau 6: Séquences des *primers* utilisés pour l'étude des exons 2,3 et 5 du gène MIC-A

F=Forward, R= Reverse

Nous avons effectué le séquençage des exons 2, 3, et 5 du gène MIC-A. Ces 3 exons permettent d'obtenir le génotype MIC-A, les exons 3 et 5 permettent, respectivement, d'étudier les polymorphismes MIC-A 129 et A5.1. Le mélange réactionnel effectué est présenté dans le [tableau n°7](#).

Réactifs	Volume par tube (µl)
H2O	17,85
Tampon Taq 10X HotStar	5
Mgcl2 25mM HotStar	5
DNTP 2mM	5
Q Solution HotStar	10
Primer F 10 pmol/µl	2,5
Primer R 10 pmol/µl	2,5
Taq HotStar 5U/µl	0,15
Volume Mix	48
ADN	2

Tableau 7: Mélange réactionnel pour la PCR MIC-A

48µL de ce mélange réactionnel ont été distribués par tube auquel nous avons rajouté 2µl d'ADN.

L'amplification pour la PCR a été effectuée selon le programme prédéfini suivant :

T0 95°C 15 min
T1 95°C 1 min
T2 60°C 1min
T3 72°C 1min
T4 72°C 10 min

} *35 cycles

La présence d'amplicons a été vérifiée par migration sur gel. Pour cela 2 µl de produit de PCR sont mélangés avec du loading Buffer (2µl) que l'on fait migrer sur du gel d'agarose à 2% avec un témoin de poids moléculaire pendant 13 min à 100V. On met en évidence alors la présence réelle d'amplicons par observation du gel sous UV, témoin d'un bon rendement de PCR (**Figure 15**).



Figure 15: Migration d'amplicons post PCR de l'exon 2 de l'allèle MIC-A sur gel d'agarose

Suivent ensuite une étape de purification enzymatique par ExoSAP afin d'effectuer un nettoyage enzymatique des produits de PCR et d'éliminer l'excès de nucléotides (DNTPs et

amorces) et une étape de réaction de séquence avec incorporation des didéoxynucléotides permettant de générer des petits fragments de suites nucléotidiques qui seront ensuite analysés. Le protocole de mélange réactionnel de *Ready Reaction Mix* est répertorié dans le **tableau n°8**.

Réactifs	Volume par puits (en µl)
(BigDye.terminator v1.1; v3. 1) 5X sequencing Buffer	3
BigDye V3.1 (Sequencing RR-100)	2
H2O	10
15 µl de ce mélange dans chaque puits	
Amorces R et F à 5pm/µl	1
Ampligène purifié	4
Volume Total	20

Tableau 8: Mélange réactionnel de la réaction de séquence du gène MIC-A

F=Forward, R= Reverse

Le mélange réactionnel est préparé pour n+1 échantillons.

La réaction de séquence a été effectuée selon le programme suivant :

98°C 1Min	} *25 cycles
98°C 10sec	
50°C 10sec	
60°C 4min	

Nous n'avons utilisé que le *primer* EXON 5R qui permettait d'amplifier la région contenant la mutation A5.1.

Enfin, une étape de purification des réactions de séquences par Big Dye® XTerminator™ nécessaire à l'élimination des amorces et des ddNTPs en excès a été réalisée. Les séquençages ont été effectués sur le plateau technique de biologie moléculaire sur l'automate Genetic Analyzer 3500XL DX®. Les fragments ainsi obtenus ont été interprétés via le logiciel *Seqpilot*® afin de déterminer la présence ou l'absence de mutation.

c) PCR en temps réel

1. Principe

Le principe de la PCR en temps réel (ou PCR quantitative, RQ-PCR) repose sur la possibilité de suivre au cours du temps la formation d'amplicons à l'aide de fluorescence. Les données de PCR correspondant aux données de fluorescence sont collectées à chaque cycle et représentent la quantité de produit de PCR amplifiée à cet instant. La fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'amplicons qui se forment. Le suivi de la fluorescence se fera durant la phase exponentielle de la réaction de PCR. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative en RQ-PCR :

- les agents se liant à l'ADN (SYBR Green).
- les sondes fluorescentes.

2. Méthode des sondes fluorescentes

La PCR quantitative en temps réel par sondes fluorescentes utilise une sonde spécifique oligonucléotidique TaqMan® couplée aux amorces spécifiques des fragments à amplifier et marquée en 5' par un fluorophore Reporter et en 3' par un fluorophore Quencher.

Le spectre d'émission du Reporter chevauche le spectre d'excitation du Quencher. Lorsque les deux fluorophores sont proches, le Quencher atténue l'émission du Reporter. Mais lorsque la Taq polymérase effectue son action d'exonucléase, le spectre du Reporter augmente. L'augmentation du signal est donc proportionnelle à la quantité de copies d'ADN obtenue à chaque cycle de PCR (**Figure 16**).

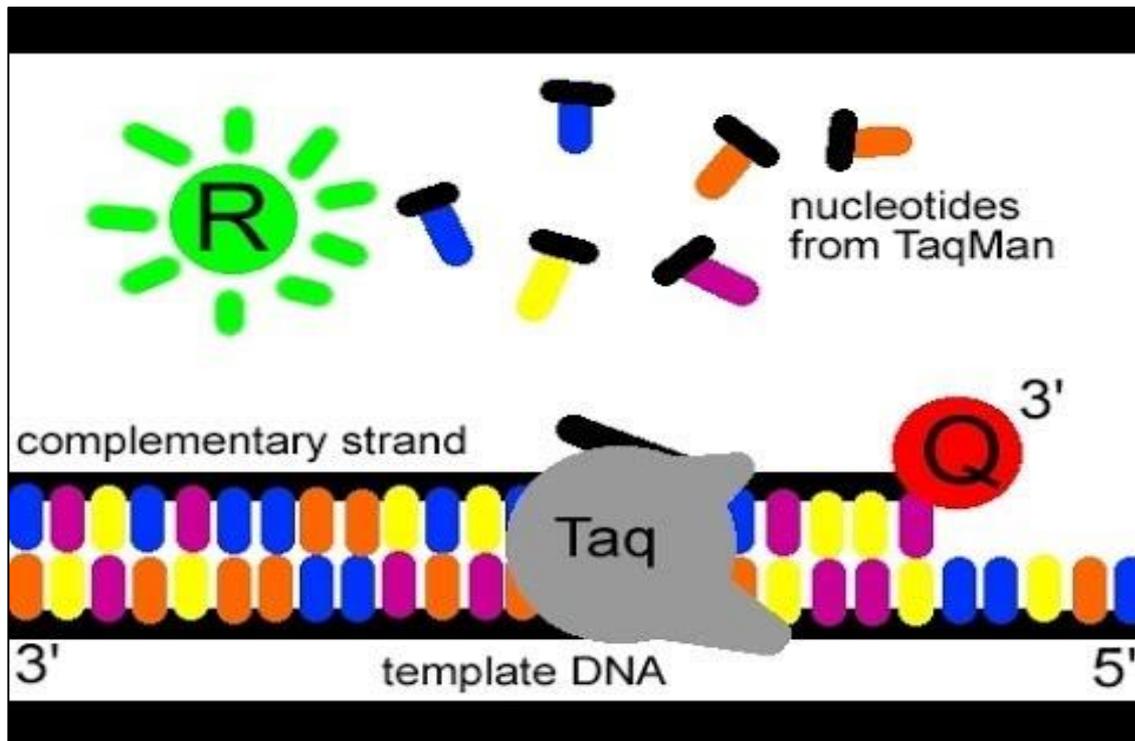


Figure 16: PCR en temps réel, méthode des sondes fluorescentes.

3. Etude du polymorphisme NKG2D par PCR en temps réel

L'ADN étudié a été au préalable dilué à 20ng/μl dans de l'eau distillée stérile pour un volume totale de 5μl. Les Mix de PCR (*Predisgn*) ont été également au préalable aliquotés pour un volume total de 10 μl. Nous avons préparé un mélange réactionnel selon le protocole Mix PCR temps réel TAQMan® du laboratoire ([tableau n°9](#)). Ce mélange réactionnel est composé de MasterMix Genotyping et d'aliqots *Predisgn* 40X préalablement décongelés et conservés à l'abri de la lumière et des prélèvements d'ADN dilués à étudier. 19 μL de mélange réactionnel plus 1 μl d'ADN dilué ont été distribués dans une plaque pour PCR temps réel. La plaque de PCR a ensuite été transportée à l'abri de la lumière et centrifugée. L'amplification PCR a été effectuée selon le programme suivant :

95°C, 10 min	}	*40 cycles
92°C, 15s		
60°C, 1min		
4°C 10 min		

Réactifs	Volume par puit (µl)
H2O	8.5
Master Mix genotyping	10
Predisgn 40X	0.5
Volume mix	19
ADN 20 µl	1
Volume total	20

Tableau 9: Mélange réactionnel PCR en temps réel, Polymorphisme NKG2D

La PCR a été effectuée sur l'automate TaqMan® au laboratoire de virologie au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS). Les génotypes ont été déterminés par interprétation des SNPs retrouvés pour chaque patient (logiciel SDS 2.4) (Figure 17).

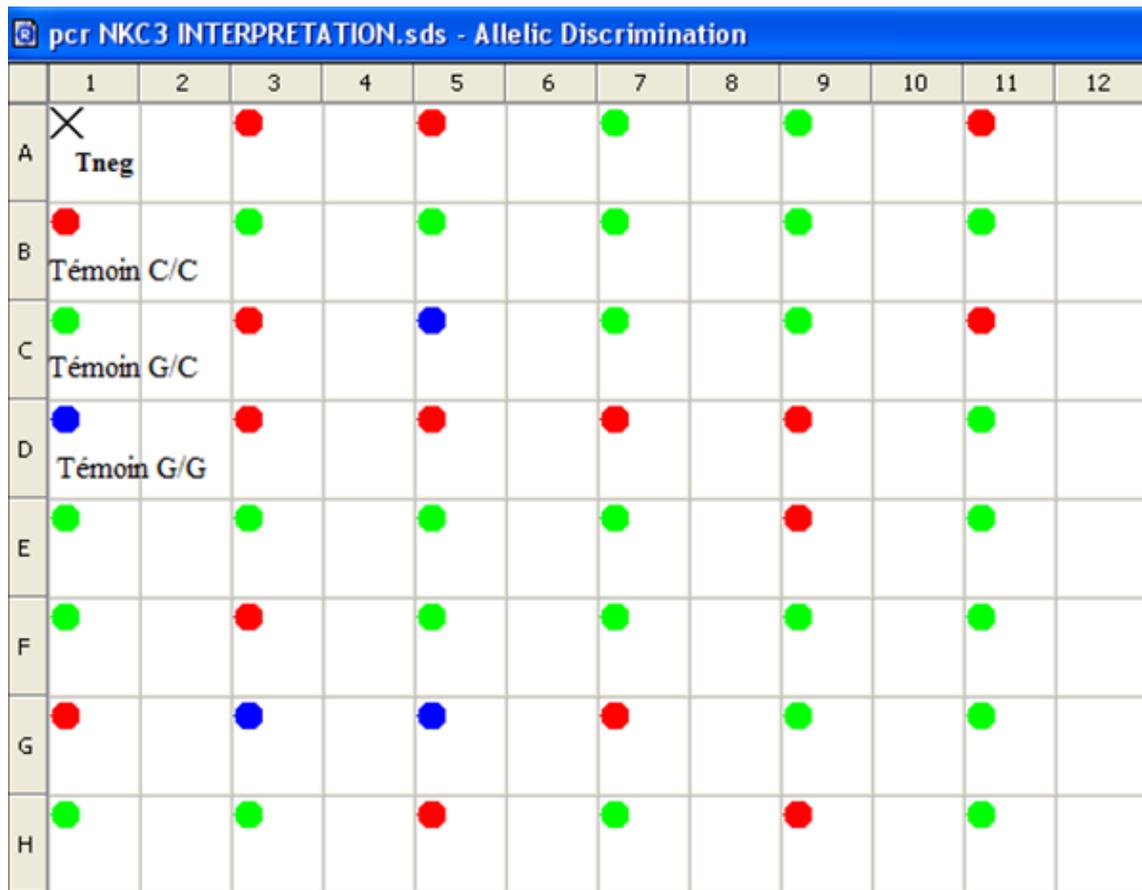


Figure 17: Interprétation du polymorphisme NKC3.

d) Méthodes statistiques

L'analyse des facteurs de risque de GVH aiguë, GVH chronique et de mortalité liée au traitement a été réalisée à l'aide des modèles univariés et multivariés de régression logistique. Certains paramètres sont analysés par des tests de Khi-deux d'indépendance associées à une analyse de risques compétitifs (GVH aiguë avec le polymorphisme NKC4 et la mutation A5.1), le décès sans GVH étant considéré comme un événement compétitif. Les variables ayant une valeur $p < 10\%$ en analyse univariée sont inclus dans un modèle multivarié avec un seuil alpha de sélection fixé à 5%. Concernant l'analyse de la survie globale (OS) et de la survie sans rechute (RFS), l'analyse a été réalisée à l'aide des modèles univariés et multivariés de Cox. Les variables ayant une valeur $p < 10\%$ en analyse univariée sont incluses dans un modèle multivarié avec seuil alpha de sélection fixé à 5%. Le logiciel SAS® version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) est utilisé pour l'analyse statistique. Les courbes de survies ont été tracées selon la méthode de Kaplan-Meier.

VII. Résultats

A. Epidémiologie des polymorphismes MIC-A/NKG2D chez les receveurs/donneurs

a) Mutation A5.1 et polymorphismes au niveau de l'exon 5

Sur les 124 patients étudiés, 61.3% présentent la mutation A5.1, dont 31.6% homozygotes et 68.4% hétérozygotes. Dans la cohorte de donneurs, 60.5% des patients présentent la mutation A5.1 dont 32% homozygotes et 68% hétérozygotes

Pour les patients comme pour les donneurs, sept polymorphismes de MIC-A ont été mis en évidence au niveau de l'exon 5 : A4 (WT), A5, A5.1, A6, A7, A8, A9. Les proportions sont exprimées dans les [tableaux n° 10 et 11](#).

Receveurs							
Polymorphisme	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A5.1
Nombres	31	22	55	1	2	22	76
Donneurs							
Polymorphisme	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A5.1
Nombres	33	21	59	2	4	15	75

Tableau 10: Répartition des polymorphismes de l'exon 5 chez les patients et leurs donneurs

Polymorphisme exon 5 (Homozygotes/Hétérozygotes)	Receveurs (n=124)	Donneurs (n=124)
A5/A5	4	0
A5.1/A5.1	24	24
A5.1/A6	26	31
A5.1/A9	13	9
A5.1/WT	6	7
A5/A5.1	7	4
A5/A6	2	4
A6/A6	6	9
A6/A9	7	4
A6/WT	14	11
A7/WT	1	2
A9/A9	2	2
WT/WT	3	4
A5/A8	2	4
A5/WT	7	9

Tableau 11: Répartitions des polymorphismes retrouvés au sein des populations

b) Génotypage du gène MIC-A

Lors de la détermination des génotypes, nous avons mis en évidence douze allèles différents (**Tableau n°12**).

Génotypage	Receveurs (n=124)	Donneurs (n=124)
008	50	54
004(009)	32	34
002	30	25
007(018)	14	25
010(025)	3	10
016	1	7
011(034)	1	1
012	0	6
017(084)	1	2
001	2	1
042(051)	0	1
033	1	0

Tableau 12: Allèles MIC-A donneurs, receveurs

Sur les 76 patients receveurs présentant la mutation A5.1, 67 sont reliés à un génotypage MIC-A 008, soit 89,5%, tandis que 75 donneurs présentent la mutation A5.1 dont 73 sont reliés à un génotypage MIC-A 008, soit 97.3%.

L'association du génotype 008/008 à l'allèle A5.1 a été confirmée par un test statistique de Khi-deux (**Tableaux n°13 et 14**).

Polymorphisme A5.1	Génotypage 008		
	Absence	Présence	Total
Absence	36(29.03%)	12(9.68%)	48
Homozygote	0(0%)	24(100%)	24
Hétérozygote	9(17.31%)	43(82.69%)	52
Total	45	79	124

Tableau 13: Tableau de contingence, génotypage 008 et allèle A5.1

Statistique	Valeur	P
Khi-deux	52.8841	<0.0001

Tableau 14: Association significative du génotypage 008 et de l'allèle A5.1, p<0,05

Comme décrit dans la littérature, de tous les allèles connus du gène MIC-A, MIC-A A5.1 (associé à MIC-A 008) est l'allèle le plus représenté dans notre cohorte de patients^{(84),(85)}.

On note également une association entre l'allèle A4 (WT) et le génotype 007. En effet, sur 31 receveurs exprimant l'allèle A4, 38.7% (12) expriment le génotype 007 et sur 33 donneurs exprimant l'allèle WT, 63.6% (21) ont un génotype 007.

Une autre association entre l'allèle A6 et le génotype 004/009 a été mise en évidence. En effet, 87.2% (48) des receveurs A6 (55) ont les génotypes 004 ou 009 alors qu'on en dénombre 77.9% chez les donneurs (Tableau n°15).

Le génotype le plus fréquent est le 008/008 (25%), suivi du génotype 004/008 (13.7%) dans le groupe des receveurs. Chez les donneurs, le génotype le plus fréquent est à l'inverse le 004/008 (28.2%) et le 008/008 (19.4%).

	A5.1	Allèle 008	P (%)	A4	Allèle 007	P (%)	A6	Allèle 004(009)	P (%)	A9	Allèle 002	P (%)
Receveurs	76	67	89.5	31	12	38.7	55	48	87.2	10	7	70
Donneurs	75	73	97.3	33	21	63.6	59	46	77.9	16	12	75

Tableau 15: Relations entre génotypage et polymorphisme au niveau de l'exon 5 chez les donneurs et les receveurs

Un antigène présent chez le receveur et absent chez le donneur entraîne la présence d'un mis-match dans le sens GVH/GVL. On parle de mis-match global lorsqu'il existe un mis-match dans les 2 sens. Sur les 124 patients, 39.5% (49) présentent un mis-match GVH/GVL et 46% (57) un mis-match global.

c) Polymorphisme MIC-A 129

En ce qui concerne le polymorphisme MIC-A 129, on retrouve 46.8% de génotype *V/V* (58), 46.8% de génotype *M/V* (58) et 6.4% de génotype *M/M* (8) pour les receveurs. Pour les donneurs, 50% expriment un génotype *V/V*, 46% un génotype *M/V*, et 4% un génotype *M/M*. On observe 10,5% (13) de mis-match MIC-A 129 entre donneurs et receveurs.

d) Polymorphisme NKG2D

Pour le polymorphisme NKC3 chez les receveurs:

- 42.7% expriment un génotype *G/C*,
- 47.6% un génotype *C/C*
- 9.7% un génotype *G/G*.

Pour le polymorphisme NKC4:

- 33.1% des patients expriment le génotype *C/T*,
- 64.5 % le génotype *C/C*
- 2.4% le génotype *T/T*.

Les donneurs quant à eux expriment pour NKC3 :

- un génotype *G/C* à 42.7%,
- un génotype *C/C* à 46%,
- un génotype *G/G* à 11.3%

Pour NKC4 :

- un génotype *C/T* à 33.1%,
- un génotype *C/C* à 63.7% et
- un génotype *T/T* à 3.2%

Les données sont répertoriées dans le [tableau n°16](#).

	Receveur n (%)	Donneur n(%)
MIC-A 129		
<i>M/M</i>	8 (6.4)	5 (4)
<i>M/V</i>	58 (46.8)	57 (46)
<i>V/V</i>	58 (46,8)	62 (50)
Allèles		
M	66 (53.2)	62 (50)
V	116 (93.5)	119 (96)
MIC-A A5.1		
Présence	76 (61.3)	75 (60.5)
Absence	48 (38.7)	49 (39.5)
Homozygote	24 (31.6)	24 (32)
Hétérozygote	52 (68.4)	51 (68)
NKC3		
<i>C/C</i>	59 (47.6)	57 (46)
<i>C/G</i>	53 (42.7)	53 (42.7)
<i>G/G</i>	12 (9.7)	14 (11.3)
Allèles		
G	65 (52.4)	67(54)
C	112 (90.3)	110 (88.7)
NKC 4		
<i>C/C</i>	80 (64.5)	79 (63.7)
<i>C/T</i>	41 (33.1)	41 (33.1)
<i>T/T</i>	3 (2.4)	4 (3.2)
Allèles		
C	121 (97.6)	120 (96.8)
T	44 (35.5)	45 (36.3)

Tableau 16: Résultats des mutations A5.1, polymorphismes MIC-A 129 et NKG2D chez receveurs et donneurs.

B. Fréquence de survenue de GVH aiguë, GVH chronique, rechute et réactivation virale en fonction des polymorphismes MIC-A/NKG2D

Au total 57.3% des patients ont développé une GVH aiguë dont 63,38% grade I et II et 36.6% grade III et IV. 24,2% ont fait de la GVH chronique, 21,8% ont rechuté, 31.5% ont eu une réactivation CMV et 32,3% une réactivation EBV. Le [tableau n°17](#) présente les données de survenue de GVH aiguë et chronique en fonction des polymorphismes MIC-A/NKG2D.

Populations	GVH aiguë	GVH Grades I, II	GVH Grades III, IV	Sans GVH aiguë	GVH chronique	Sans GVH chronique	Total
n(%)	71(57.26)	45(36.29)	26(20.97)	53(42.74)	30(24.19)	94(75.81)	124
Absence receveurs A5.1	25(35.21)	15(33.33)	10(38.46)	23(43.40)	11(36.67)	37(39.36)	48 (36.29)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Homozygote receveurs A5.1	10(14.08)	8(17.78)	2(7.69)	14(26.42)	3(10)	21(22.34)	24(19.35)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Hétérozygote receveurs A5.1	36(50.70)	22(48.89)	14(53.85)	16(30.19)	16(53.33)	36(38.30)	52(41.93)
<i>P</i>	<i>P=0.0131</i>	<i>P=0.006</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>P=0.04</i>	<i>ns</i>	
MIC-A 129 receveurs V/V	33(46.48)	17(37.78)	16(61.54)	25(47.17)	19(63.33)	39(41.49)	58(46.77)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
MIC-A 129 receveurs M/V	35(49.30)	27(60)	8(30.77)	23(43.34)	10(33.33)	48(51.06)	58(46.77)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
MIC-A 129 receveurs M/M	3(4.23)	1(2.2)	2(7.69)	5(9.43)	1(3.33)	7(7.44)	8(6.45)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC3 donneurs C/C	40(56.34)	25(55.56)	15(57.69)	17(35.85)	17(56.67)	42(44.67)	57(46)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC3 donneurs C/G	27(39.03)	17(37.78)	10(38.46)	26(49.06)	12(40)	41(43.62)	53(42.7)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC3 donneurs G/G	4(5.63)	3(6.7)	1(3.85)	10(15.09)	1(3.33)	11(11.7)	14(11.3)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC4 donneurs C/C	52(73.24)	33(73.33)	19(73.08)	27(50.94)	22(73.33)	57(60.63)	79(64.16)
<i>P</i>	<i>P=0.0131</i>	<i>P=0.004</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC4 donneurs C/T	19(26.76)	12(26.67)	7(26.93)	22(41.51)	8(26.67)	33(35.11)	41(33.06)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
NKC4 donneurs T/T	0(0)	0(0)	0(0)	4(7.55)	0(0)	4(4.55)	4(3.22)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Mis-match GVH/GVL	23(32.39)	14(31.11)	9(34.61)	26(49.06)	13(43.33)	36(38.30)	49(39.51)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
Mis-match Global	28(39.44)	17(37.78)	11(42.31)	29(54.72)	16(53.33)	41(43.62)	57(45.97)
<i>P</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

Tableau 17: GVH aiguë et chronique en fonction des polymorphismes receveurs

ns= non significative

C. Association significative de la mutation A5.1 chez le receveur avec la survenue de GVH aiguë et GVH chronique, sans impact sur la survie

Les patients hétérozygotes pour la mutation A5.1 ont développé plus de GVH aiguë tous grades confondus ([tableaux n°17,18, 19, 20](#)).

Analyse univariée				Analyse multivariée		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
MIC-A-A5.1 Homozygote vs. absence	0.81	[0.30; 2.17]	<i>0.0648</i>			
Hétérozygote vs. absence	3.67	[1.56; 8.65]	0.0007			
MIC-A-A5.1 (Hétérozygote+ homozygote vs. absence)	2.13	[1.02; 4.44]	<i>0.0439</i>			
MIC-A-A5.1 (hétérozygote vs. homozygote+absence)	2.60	[1.22; 5.56]	0.0131	2.38	[1.10; 5.15]	0.0277

Tableau 18: risque de développement de la GVH aiguë chez les receveurs hétérozygotes pour la mutation A5.1

OR : Odd Ratio

Mutation A5.1	GVH aiguë		Total
	Non	Oui	
Absence	23(43,40%)	25(35.21%)	48
Homozygote	14(26.42%)	10(14.08%)	24
Hétérozygote	16(30,19%)	36(50.70%)	52
Total	53	71	124

Tableau 19: Tableau de contingence, A5.1 hétérozygotes, receveurs

Statistique	Valeur	P
Khi-2	12.2370	0.0022

Tableau 20: A5.1 hétérozygotes, receveurs

L'impact de la mutation A5.1 chez le receveur sur la survenue de GVH aiguë (grades I et II vs. grades III et IV) a ensuite été étudié par analyse du risque compétitif. Les courbes correspondent au délai de survenue de GVH aiguë avant décès. (**Figure 18**).

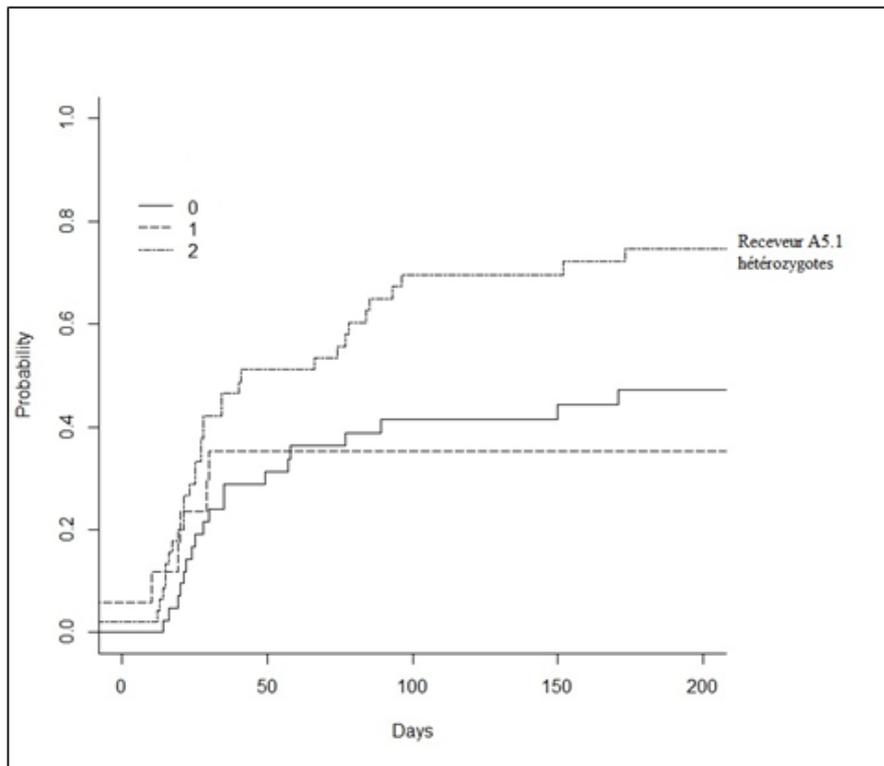


Figure 18: Délai de survenue de GVH aiguë en fonction du polymorphisme A5.1 en risque compétitif

0 =Absence de la mutation A5.1, 1= Homozygote, 2 =Hétérozygote

On observe une augmentation du risque de développement de GVH aiguë grades I et II lorsque les receveurs sont hétérozygotes pour la mutation A5.1 (**$P=0.006$**)

Il a été également mis en évidence, en analyse univariée, une augmentation du risque de GVH chronique chez les patients hétérozygotes pour la mutation A5.1, ($P=0.04$).

Nous ne notons aucune association significative chez les receveurs entre la mutation A5.1 avec la survie globale (OS) et la survie sans rechute (RFS) (**Tableaux n°21, 22 ; Figures 19, 20**).

	OR	IC 95%	P
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. absence	0.93	[0.43; 2.03]	<i>0.8558</i>
Hétérozygote vs. absence	0.59	[0.31; 1.14]	<i>0.1195</i>
MIC-A A5.1 (Homozygote+ hétérozygote vs. absence)	0.69	[0.38; 1.22]	<i>0.2029</i>
Mis-match MIC-A A5.1	0.92	[0.45; 1.88]	<i>0.8236</i>

Tableau 21: OS en fonction de la mutation A5.1, receveurs

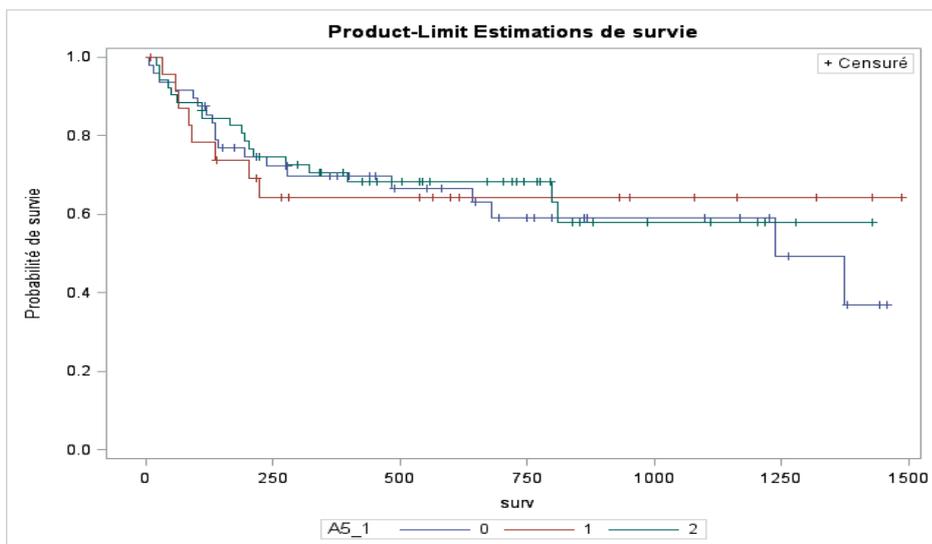


Figure 19: OS en fonction de la mutation A5.1 chez le receveur, $P=0,86$

0 =Absence de la mutation A5.1, 1 = Homozygote, 2 =Hétérozygote

	OR	IC 95%	P
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. absence	1.28	[0.63; 2.60]	0.4961
Hétérozygote vs. absence	0.68	[0.37; 1.27]	0.2261
MIC-A A5.1 (Hétérozygote+ homozygote vs. absence)	0.78	[0.45; 1.35]	0.3835
Mis-match MIC-A A5.1	0.95	[0.38; 2.39]	0.9141

Tableau 22: RFS en fonction de la mutation A5.1, receveurs.

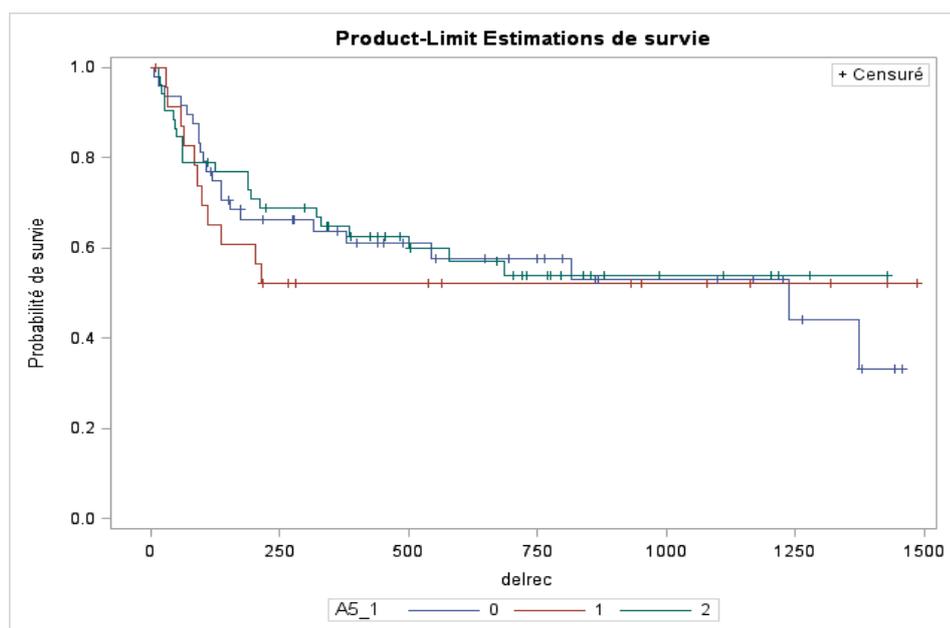


Figure 20: RFS en fonction de la mutation A5.1 chez le receveur, $P=0.91$

0 =Absence de la mutation A5.1, 1= Homozygote, 2 =Hétérozygote

D. Le polymorphisme NKC4 C/C (*LNK2/LNK2*) chez le donneur est associé à un risque de survenue de GVH aiguë chez le receveur sans impacter la survie (OS, RFS).

Les **tableaux n°23 et 24** mettent en évidence l'association significative entre le polymorphisme C/C (*LNK2/LNK2*) chez le donneur et la GVH aiguë.

NKC4	GVH aiguë		Total
	Non	Oui	
C/C	27(50.94%)	52(73.24%)	79
C/T	22(41.51%)	19(26.76%)	41
T/T	4(7.55%)	0	4
Total	53	71	124

Tableau 23: Tableau de contingence, polymorphisme NKC4 des donneurs

Statistique	Valeur	P
Khi-2	8.6692	0.0131

Tableau 24: Polymorphisme NKC4 C/C des donneurs

En analyse du risque compétitif, on observe une plus forte probabilité de développement de GVH aiguë (grades I et II) pour les donneurs ayant un polymorphisme C/C (*LNK2/LNK2* de faible affinité ; **P=0.004**; **Figure 21**).

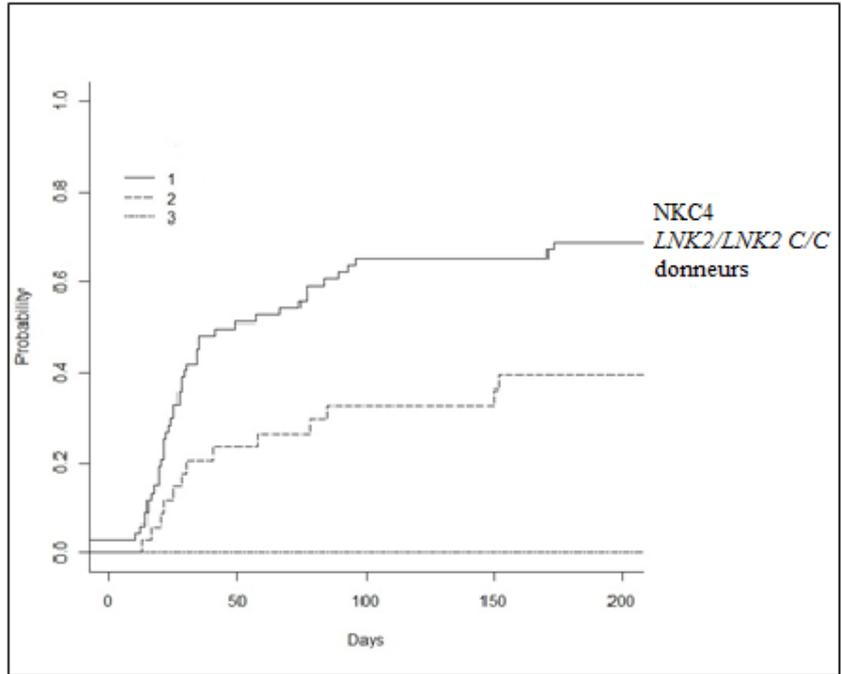


Figure 21: Délai de survenue de GVH aiguë en fonction du polymorphisme NKC4 chez les donneurs

1= NKC4C/C, 2= NKC4C/T, 3= NKC4T/T

Nous notons l'absence d'impact du polymorphisme sur la survie (OS, RFS; [tableaux n°25, 26](#) ; [Figures 22, 23](#)).

	OR	IC 95%	P
NKC4	1.08	[0.59; 1.97]	0.8060

Tableau 25: OS en fonction de NKC4

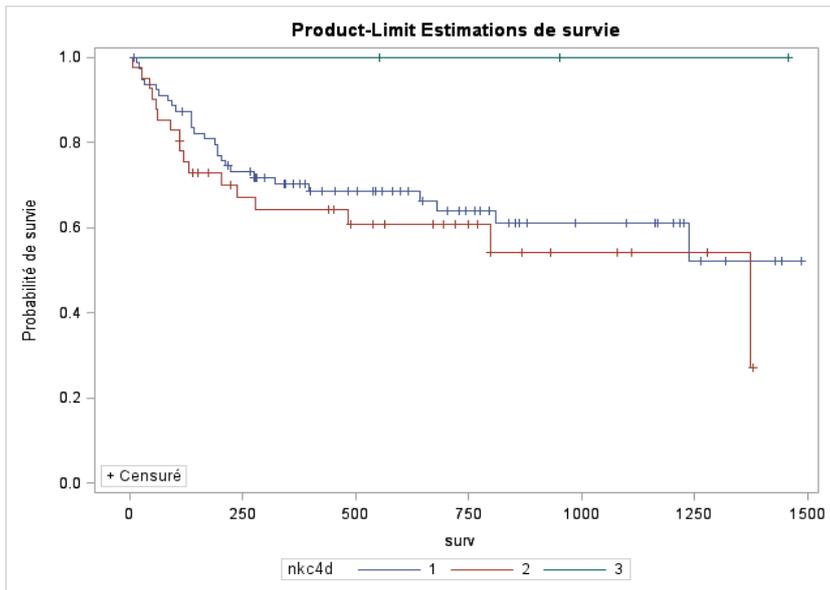


Figure 22: OS en fonction de NKC4 du donneur, $P= 0.806$

1= NKC4C/C, 2= NKC4C/T, 3= NKC4T/T

	HR	IC 95%	P
NKC4	1.00	[0.57; 1.76]	0.989

Tableau 26: RFS en fonction de NKC4

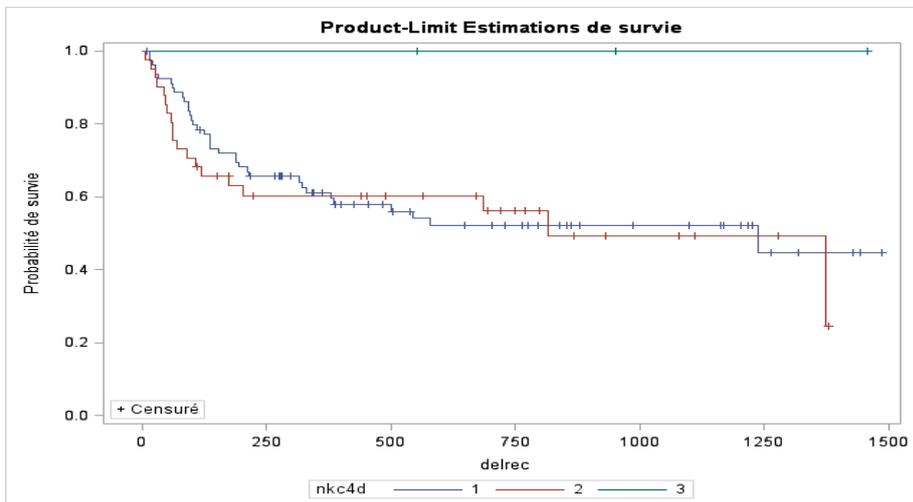


Figure 23: RFS en fonction de NKC4 du donneur, $P=0.989$

1= NKC4C/C, 2= NKC4C/T, 3= NKC4T/T

E. L'utilisation d'une donneuse « femme » pour un receveur « homme » impacte la survenue de GVH chronique

En analyse univariée et multivariée, l'utilisation d'une donneuse pour un receveur « homme » est associée à de la GVH chronique au seuil de 10%.

	Analyse univariée			Analyse multivariée		
	OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
Femme pour Homme	2.45	[0.93; 6.43]	<i>0.0690</i>	2.45	[0.93; 6.43]	<i>0.0690</i>

Tableau 27: Risque de GVH chronique en fonction du sexe du donneur.

F. Paramètres non significatifs

a) GVH aiguë

	OR	IC 95%	P
Mis-match GVH/GVL	1.30	[0.73; 2.34]	<i>0.3751</i>
Mis-match global A	1.40	[0.78 ; 2.52]	<i>0.2252</i>
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. absence	0.93	[0.43; 2.03]	<i>0.8558</i>
Hétérozygote vs. absence	0.59	[0.31; 1.14]	<i>0.1195</i>
MIC-A A5.1 (Homozygote+hétérozygote vs. absence)	0.69	[0.38; 1.22]	<i>0.2029</i>
Mis-match MICA A5.1	0.92	[0.45; 1.88]	<i>0.8236</i>
MIC-A 129			
M/V vs. V/V	0.81	[0.44; 1.48]	<i>0.4891</i>
M/M vs. V/V	0.97	[0.23; 4.13]	<i>0.9709</i>
MIC-A 129 (M/V+ M/M vs. V/V)	0.82	[0.46; 1.48]	<i>0.5115</i>
Mis-match MIC-A 129	1.16	[0.46; 2.94]	<i>0.7552</i>
NKC3	1.35	[0.74; 2.46]	<i>0.3193</i>
NKC4	1.08	[0.59; 1.97]	<i>0.8060</i>
Réactivation CMV	1.35	[0.68; 2.68]	<i>0.3829</i>
Réactivation EBV	0.64	[0.31; 1.30]	<i>0.2142</i>
Compatibilité ABO	0.75	[0.41; 1.36]	<i>0.3468</i>
Compatibilité ABO majeure	2.01	[0.99; 4.06]	<i>0.0523</i>
Femme pour homme	0.81	[0.38; 1.75]	<i>0.5988</i>
Sexe (femme vs. homme)	0.56	[0.28; 1.13]	<i>0.1034</i>

Tableau 28: Absence d'impact sur la GVH aiguë.

b) GVH chronique

	OR	IC 95%	P
Mis-match GVH/GVL	0.43	[0.21; 0.89]	0.0235
Mis-match global A	0.52	[0.25 ; 1.08]	0.0795
Mis-match MIC-A A5.1	1.45	[0.56; 3.72]	0.4427
MIC-A 129			
<i>M/V vs. V/V</i>	0.55	[0.09; 3.52]	0.4074
<i>M/M vs. V/V</i>	1.41	[0.68; 2.94]	0.2392
MIC-A 129 (<i>M/V+M/M vs. V/V</i>)	0.96	[0.47; 1.96]	0.9064
Mis-match MIC-A 129	1.01	[0.30; 3.39]	0.9842
NKC3	1.16	[0.57; 2.37]	0.6889
NKC4	0.74	[0.35; 1.55]	0.4209
Réactivation CMV	0.98	[0.38; 2.51]	0.9657
Réactivation EBV	0.90	[0.42; 1.94]	0.7839
Compatibilité ABO	1.38	[0.66; 2.87]	0.3909
Compatibilité ABO majeure	1.53	[0.53; 4.39]	0.4261
Femme pour Homme	0.74	[0.30; 1.85]	0.5267
Sexe (femme vs. homme)	0.66	[0.31; 1.40]	0.2788

Tableau 29: Absence d'impact sur la GVH chronique

c) OS

	OR	IC 95%	P
Mis-match GVH/GVL	1.08	[0.47; 2.47]	0.8586
Mis-match global A	1.30	[0.57 ; 2.96]	0.5340
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. Absence	0.78	[0.22; 2.80]	0.3664
Hétérozygote vs. Absence	1.78	[0.72; 4.44]	0.1139
MIC-A A5.1 donneur (Hétérozygote + homozygote vs. absence)	1.42	[0.60; 3.36]	0.4275
Mis-match MIC-A A5.1	0.61	[0.19; 1.95]	0.4022
MIC-A 129			
<i>M/V vs. V/V</i>			
<i>M/M vs. V/V</i>			
MIC-A 129 (<i>M/V+ M/M vs. V/V</i>)	0.49	[0.21; 1.14]	0.0967
Mis-match MIC-A 129	1.05	[0.26; 4.16]	0.9447
NKC3	0.57	[0.25; 1.30]	0.1795
NKC4	0.45	[0.17; 1.15]	0.0949
Réactivation CMV	1.46	[0.52; 4.10]	0.4738
Réactivation EBV	0.94	[0.38; 2.32]	0.9018
Compatibilité ABO	0.89	[0.38; 2.06]	0.7858
Compatibilité ABO majeure	1.71	[0.58; 5.03]	0.3309
Sexe (femme vs. homme)	1.23	[0.52; 2.92]	0.6303

Tableau 30: Absence d'impact sur l'OS

d) RFS

	OR	IC 95%	P
Mis-match GVH/GVL	1.04	[0.60; 1.80]	0.8776
Mis-match global A	1.18	[0.68 ; 2.02]	0.5576
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. absence	1.28	[0.63; 2.60]	0.4961
Hétérozygote vs. absence	0.68	[0.37; 1.27]	0.2261
MIC-A A5.1 (homozygote+ hétérozygote vs. absence)	0.78	[0.45; 1.35]	0.3835
Mis-match MICA-A5.1	0.95	[0.38; 2.39]	0.9141
MIC-A 129			
M/V vs. V/V	0.88	[0.51; 1.54]	0.6653
M/M vs. V/V	0.89	[0.21; 3.77]	0.8775
MIC-A 129 (M/V+ M/M vs. V/V)	0.79	[0.46; 1.36]	0.4028
Mis-match MICA129	0.95	[0.38; 2.39]	0.9141
NKC3	1.27	[0.73; 2.20]	0.3959
NKC4	1.00	[0.57; 1.76]	0.9891
Réactivation CMV	1.22	[0.64; 2.32]	0.5465
Réactivation EBV	0.86	[0.46; 1.59]	0.6315
Compatibilité ABO	0.73	[0.42; 1.28]	0.2736
Incompatibilité ABO majeure	1.81	[0.91; 3.61]	0.0921
Femme pour homme	0.89	[0.44; 1.77]	0.7353
Sexe (femme vs. homme)	0.74	[0.40; 1.37]	0.3425

Tableau 31: Absence d'impact sur la RFS

e) Mortalité liée au traitement (TRM)

	OR	IC 95%	P
Mis-match GVH/GVL	1.31	[0.61; 2.78]	0.4851
Mis-match global	1.59	[0.75 ; 3.37]	0.2286
MIC-A A5.1			
Homozygote vs. absence	1.03	[0.38; 2.84]	0.6022
Hétérozygote vs. absence	0.65	[0.28; 1.52]	0.2735
MIC-A A5.1 (homozygote+ hétérozygote vs. absence)	0.76	[0.36; 1.63]	0.4830
Mis-match MIC-A A5.1	1.10	[0.42; 2.85]	0.8462
MIC-A 129			
M/V vs. V/V	1.05	[0.49; 2.26]	0.8290
M/M vs. V/V	1.40	[0.22; 9.05]	0.7381
MIC-A 129 (M/V+ M/M vs. V/V)	1.08	[0.51; 2.27]	0.8486
Mis-match MIC-A 129	1.01	[0.29; 3.58]	0.9834
NKC3	1.31	[0.62; 2.80]	0.4798
NKC4	0.87	[0.40; 1.90]	0.7272
Réactivation CMV	1.28	[0.51; 2.25]	0.6005
Réactivation EBV	0.50	[0.21; 1.20]	0.1208
Incompatibilité ABO majeure	1.09	[0.50; 2.36]	0.8317
Femme pour homme	0.67	[0.24; 1.84]	0.4327
Sexe (femme vs. homme)	0.74	[0.40; 1.37]	0.3425

Tableau 32: Absence d'impact sur la TRM

VIII. Discussion

Les polymorphismes MIC-A et NKG2D ont été étudiés dans de nombreux contextes pathologiques autres que l'allogreffe de CSH. La présence de la mutation A5.1 sur les cellules du greffon d'un donneur a été impliquée dans la survenue de rejet humoral aiguë dans le cadre de transplantations rénales⁽⁸⁶⁾.

Le polymorphisme MIC-A 129, notamment la présence homozygote de la méthionine, est associée à la survenue de psoriasis⁽⁸⁷⁾. Certains polymorphismes du gène MIC-A (MIC-A 007, MIC-A 019) sont également associés à la spondylarthrite ankylosante indépendamment du gène HLA-B*27⁽⁸⁸⁾.

Dans les greffes géno et phéno-identiques, nous avons montré une association entre la présence d'une hétérozygotie MIC-A A5.1 chez le receveur et une augmentation significative de GVH aiguë grades I et II. L'haplotype NKG2D-LNK2 est aussi relié à la GVH aiguë (grades I et II). Les autres marqueurs étudiés (MIC-A 129 chez le receveur et les polymorphismes NKG2D (HNK1-LNK1) chez le donneur) n'influencent pas l'OS et la RFS.

A. En fonction de la mutation A5.1

Suemizu et al. ont prouvé que l'allèle MIC-A A5.1 était à l'origine de la production d'une protéine tronquée, transportée à la surface apicale de la cellule endothéliale du tissu intestinale. Or, l'expression de la protéine native s'effectue plutôt à la surface basolatérale de la cellule, site potentiel d'interaction avec les cellules T et NK. De plus, l'allèle MIC-A A5.1 est associé à la production d'une forme soluble de MIC-A, dérivant du clivage protéolytique de la protéine exprimée à la surface membranaire des cellules. L'endocytose ultérieure du complexe NKG2D/MIC-A soluble compromettrait l'activité cytotoxique⁽⁸⁹⁾.

Des études menées *in vitro*, ont montré que la présence de MIC-A A5.1 (008) était à l'origine :

- de la libération de la protéine entière via la sécrétion d'exosomes

- d'un rétrocontrôle négatif et de la diminution de l'expression des récepteurs NKG2D sur les cellules NK, associés à une baisse en parallèle de l'activité cytotoxique des cellules NK. Néanmoins, l'exposition des lymphocytes T CD8+ (LTCD8+) à la protéine MIC-A A5.1 (008) contenue dans les exosomes n'affecterait pas de manière significative la capacité des lymphocytes T CD8+ à la lyse cellulaire⁽⁹⁰⁾.

L'augmentation significative de GVH aiguë chez nos patients portant la mutation A5.1 pourrait être expliquée par ces évènements. La diminution de l'activité des cellules NK entraînerait une majoration de la présentation d'antigène par les CPA immatures du receveur, en parallèle à la diminution de leur lyse par les cellules NK du donneur, tout en conservant l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+.

Par contre, nous observons une diminution du risque de développement de GVH aiguë chez les patients homozygotes pour la mutation A5.1 (OR=0.81, $P=0.0648$). La présence de la mutation en double exemplaire serait donc un facteur protecteur, probablement dû à une diminution plus importante des récepteurs NKG2D à la surface des cellules NK, mais avec cette fois-ci un impact potentiel sur l'activité des LTCD8+, responsable de la GVH. Cet aspect protecteur de la mutation A5.1 homozygote est confirmé par une étude récente de Anderson et al.⁽⁹¹⁾. A noter toutefois que Parmar et al., sur une cohorte de 236 patients, ne retrouvent pas de lien entre la présence de MIC-A A5.1 (008) et la survenue de GVH⁽⁸⁵⁾. Anderson et al. retrouvent, sur une faible cohorte de 38 allogreffes, une tendance à la diminution de l'incidence de GVH aiguë en présence de MIC-A A5.1 (008) chez le receveur.

B. En fonction du polymorphisme NKC4 LNK2/LNK2 (=C/C)

Des études préliminaires sur l'impact du polymorphisme du gène NKG2D dans l'allogreffe de CSH, dans un groupe de patients définis comme présentant des risques standards (LAM, LAL, lymphome en RC1), ont mis en évidence une meilleure survie globale chez les receveurs allogreffés 10/10 avec des donneurs NKG2D-*HNK1* (OR=0.44, $P=0.01$) ainsi qu'une diminution de la TRM. On ne note néanmoins aucun impact sur la rechute ou le développement de GVH. Ces résultats n'ont toutefois pas été retrouvés sur une cohorte de patients à haut risque⁽⁹²⁾.

Notre étude met en évidence un risque de développement de GVH aiguë chez des receveurs allogreffés avec des donneurs présentant deux haplotypes NKG2D-*LNK2(C/C)*, conférant une faible activité cytotoxique aux cellules NK, mais la relation entre ces deux évènements cliniques et moléculaires restent encore à éclaircir. Nous pouvons poser l'hypothèse que le statut *LNK2* du donneur, avec une baisse de l'activité cytotoxique des cellules NK, pourrait être à l'origine d'une diminution de la lyse cellulaire des CPA immatures du receveur, avec pour corollaire une augmentation de la présentation d'antigènes du soi au LTCD8+, ce qui a pour conséquence le développement de GVH.

C. En fonction de MIC-A 129

La présence d'un génotype MIC-A 129 *valine/valine* est associée à une augmentation de l'incidence de GVH chronique avec un effet additif de la présence de forme soluble de MIC-A, tandis que la présence d'anticorps anti MIC-A confère une protection vis-à-vis de la GVH chronique (cohorte de 211 patients allogreffés)⁽⁷⁴⁾.

Ces observations soulignent qu'une faible activité cytotoxique de la cellule NK via son interaction avec MIC-A (MIC-A 129 *valine/valine* et MIC-A solubles) favorise l'émergence de la GVH alors qu'une activité cytolytique non entravée (les anticorps anti-MIC-A permettant de diminuer le taux sérique de MIC-A solubles) ont un effet inverse. Cette hypothèse peut être étayée par l'association, dans cette même cohorte de patients, entre MIC-A 129 *méthionine/méthionine* et une augmentation de l'incidence de la rechute, probablement lié à un effet protecteur de ce polymorphisme, vis à vis de la GVH chronique, et donc sans doute un effet GVL moindre. Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé de lien entre les polymorphismes MIC-A 129 et les paramètres cliniques étudiés, soulignant la nécessité d'obtenir des cohortes importantes pour observer des corrélations réalisées par des études multiparamétriques.

D. En fonction du mis-match MIC-A

Nous n'avons mis en évidence aucune relation entre les mis-matches GVH/GVL, globaux et mis-matches MIC-A 129, dans la survenue de GVH aiguë ni d'impact sur la survie, contrairement aux études de Carapito et al., Fuerst et al., ainsi que Askar et al., ^{(93),(94),(95)}. Cependant, les impacts d'un tel mis-match MIC-A entre le donneur et le receveur restent controversés dans la littérature.

Sur une série de 922 allogreffes, Carapito et al. montrent que les mis-matches MIC-A sont associés à une augmentation de l'incidence de GVH aiguë grades III-IV, de GVH chronique et de la mortalité sans rechute.

Pour Parmar et al., le taux de GVH aiguë de grades II à IV est plus élevé en présence d'un mis-match MIC-A. Toutefois sa cohorte de 236 allogreffes inclue des greffes 10/10 et 9/10⁽⁸⁵⁾.

D'autres études s'opposent à ces résultats, comme celles d'Anderson et al. ainsi que Park et al., où il n'est mis en évidence aucune relation entre MIC-A et GVH sur des cohortes, respectivement de 38 et 59 allogreffes ^{(91),(96)}.

Cette disparité de résultats peut s'expliquer par l'absence d'homogénéité entre les populations en termes de pathologies et par la différence de taille de l'échantillon. Les données obtenues sont, dans ces conditions, difficilement comparables.

Les disparités retrouvées dans la littérature, en comparaison avec notre étude, peuvent s'expliquer par de nombreux autres critères.

Tout d'abord, certaines études intègrent parfois des patients greffés avec un mis-match 9/10. Pour l'étude spécifique de l'implication des gènes MIC-A, il faut toutefois veiller à ne pas introduire de cas avec des mis-matches HLA-B. En effet, il existe un déséquilibre de liaison entre le HLA-B de classe I et le gène MIC-A. Notre cohorte n'est composée que de patients allogreffés en compatibilité 10/10, dont 44.4% ont reçu une greffe géno-identique. Nous avons donc potentiellement peu de mis-match MIC-A dans notre cohorte.

De plus, peu d'études intègrent la détermination HLA-DPB1 pour définir dans les allogreffes 10/10, les compatibilités 12/12, 11/12 et 10/12. Les mis-matches HLA-DPB1 sont, en théorie, absents dans les greffes géno-identiques mais sont présents, jusqu'à 80%, dans des greffes phéno-identiques. Il est admis aujourd'hui que certains mis-matches sur ce locus augmentent

l'incidence de la GVH. L'incidence des mis-matches sur les loci DRB3, DRB4 et DRB5 (pour définir des allogreffes 14/14) restent encore actuellement controversée.

La répartition des indications d'allogreffes varie également beaucoup d'une étude à l'autre, notamment la proportion d'hémopathies myéloïdes versus lymphoïdes, ainsi que la présence de nombreux cas de leucémies myéloïdes chroniques dans les études rétrospectives.

L'activité cytotoxique des cellules NK a été démontrée dans des pathologies myéloïdes, notamment les LAM. En effet, la densité antigénique des ligands pour NKG2D diffère, notamment entre des blastes myéloïdes et lymphoïdes B, entraînant sans doute une répercussion sur l'activité cytotoxique des lymphocytes exprimant NKG2D. Notre population composite de patients ne permet sans doute pas d'étudier de façon optimale le lien entre les polymorphismes MIC-A/NKG2D et les critères cliniques de type OS et RFS.

Les protocoles de conditionnement peuvent également expliquer les disparités entre les études, notamment lorsqu'ils impliquent une déplétion en lymphocyte T *in vivo* par injection de sérum anti lymphocytaire (SAL).

Le nombre de sujets étudiés (124) semblerait être un facteur limitant dans notre étude. Les principales autres études incluent généralement plus de 200 patients allogreffés.

Enfin, la médiane de suivi de nos patients (14,88 mois [0,20 ; 48,85]) est relativement courte étant donné la présence de patients allogreffés de moins d'un an dans la cohorte, ce qui pourrait expliquer l'absence de données statistiquement significatives sur la survie globale (31,4% de la population a été suivi à plus de 24 mois).

IX. Conclusion

La survenue de GVH est une des causes majeures de mortalité suite à l'allogreffe de CSH. L'incidence reste élevée malgré le respect de la compatibilité HLA classes I (A, B, C) et II (DPB1, DQB1, DRB1) entre donneurs et receveurs. L'utilisation de cellules NK dans des pathologies myéloïdes visant à obtenir un effet GVL sans effet délétère (GVH) est en phase de recherche. Notre étude met en évidence un impact significatif de survenue de GVH aiguë et chronique en fonction de certains polymorphismes MIC-A et NKG2D sans impacter la survie.

L'exploration de molécules telles que MIC-A, ainsi que l'étude de polymorphismes des récepteurs NKG2D, pourraient améliorer la prise en charge du patient, en aiguillant le choix des donneurs par prédiction d'un risque potentiel de développement de GVH ou de pronostic moins favorable pour le patient.

X. Bibliographie

1. Baron F, Storb R. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Following Nonmyeloablative Conditioning as Treatment for Hematologic Malignancies and Inherited Blood Disorders. *Mol Ther.* 2006 Jan;13(1):26–41.
2. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic Effect of Graft-versus-Host Disease in Human Recipients of Allogeneic-Marrow Grafts. *N Engl J Med.* 1979 May 10;300(19):1068–73.
3. Ruggeri L, Parisi S, Urbani E, Curti A. Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Oct 15 [cited 2016 Aug 24];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4606119/>
4. Bensinger WI. Recent developments in hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2003 Apr;77(3):232–8.
5. Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cell? *Haematol* 2016 June 1016. 2016 Jun;
6. Nguyen S, Blaise D, Bay J-O, Chevallier P, Contentin N, Dhédin N, et al. Greffes de cellules souches hématopoïétiques à partir d'un donneur haploidentique : recommandations de la SFGM-TC (deuxième partie). *Pathol Biol.* 2014 Aug;62(4):185–9.
7. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.* 2015 Aug;50(8):1037–56.
8. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood.* 2002 Sep 1;100(5):1611–8.
9. Rodrigues CA, Rocha V, Dreger P, Brunstein C, Sengeloev H, Finke J, et al. Alternative donor hematopoietic stem cell transplantation for mature lymphoid malignancies after reduced-intensity conditioning regimen: similar outcomes with umbilical cord blood and unrelated donor peripheral blood. *Haematologica.* 2014 Feb;99(2):370–7.
10. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood.* 2010 Nov 25;116(22):4693–9.
11. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1343–7.
12. Rodrigues CA, Sanz G, Brunstein CG, Sanz J, Wagner JE, Renaud M, et al. Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):256–63.

13. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Brunstein CG, Cao Q, DeFor TE, Verneris MR, et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2410–5.
14. Cornelissen JJ, Putten WLJ van, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SMG, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*. 2007 May 1;109(9):3658–66.
15. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA J Am Med Assoc*. 2009 Jun 10;301(22):2349–61.
16. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers MED, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):756–62.
17. M M. [Allogeneic hematopoietic stem cell transplantations]. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang*. 2011 2011;18(2):235–45.
18. Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci*. 2007 Aug;98(8):1139–46.
19. Falkenburg JHF, Marijt W a. F, Heemskerk MHM, Willemze R. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr Opin Hematol*. 2002 Nov;9(6):497–502.
20. Mistrik M, Bojtarova E, Sopko L, Masakova L, Roziakova L, Martinka J, et al. Graft-versus-host disease management. *Bratisl Lekárske Listy*. 2016;117(7):388–96.
21. Vigorito AC, Campregher 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.
22. Takatsuka H, Takemoto Y, Okada M, Sawada A, Katsuno T, Wada H, et al. Changes of cytokines during the course of graft-versus-host disease following bone marrow transplantation: a case report. *Cytokine*. 2000 Aug;12(8):1225–7.
23. Deeg HJ. Cytokines in graft-versus-host disease and the graft-versus-leukemia reaction. *Int J Hematol*. 2001 Jul;74(1):26–32.
24. Hill GR, Krenger W, Ferrara JL. The role of cytokines in acute graft-versus-host disease. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1997 Dec;3(4):257–66.
25. Gatza E, Choi SW. Approaches for the prevention of graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation. *Int J Hematol Oncol*. 2015 Aug;4(3):113–26.
26. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974 Oct;18(4):295–304.
27. 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.

28. Krenger W, Hill GR, Ferrara JL. Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1997 Aug 27;64(4):553–8.
29. Ferrara JLM, Reddy P. Pathophysiology of Graft-Versus-Host Disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1):3–10.
30. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):374–84.
31. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ. Biologic markers of chronic graft vs. host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Mar;49(3):324–31.
32. Yu J, Storer BE, Kushekhar K, Zaid MA, Zhang Q, Gafken PR, et al. Biomarker Panel for Chronic Graft-Versus-Host Disease. *J Clin Oncol*. 2016 May 23;JCO659615.
33. Pavletic SZ, Smith LM, Bishop MR, Lynch JC, Tarantolo SR, Vose JM, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem-cell transplantation. *Am J Hematol*. 2005 Apr;78(4):265–74.
34. Martin PJ, Lee SJ, Przepiorka D, Horowitz MM, Koreth J, Vogelsang GB, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: VI. The 2014 Clinical Trial Design Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1343–59.
35. Linhares YPL, Pavletic S, Gale RP. Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help? *Bone Marrow Transplant*. 2013 Feb;48(2):203–9.
36. Deeg HJ, Socie G, Schoch G, Henry-Amar M, Witherspoon RP, Devergie A, et al. Malignancies after marrow transplantation for aplastic anemia and fanconi anemia: a joint Seattle and Paris analysis of results in 700 patients. *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):386–92.
37. Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II–III trial. *The Lancet*. 2005 Aug;366(9487):733–41.
38. Chao NJ, Chen BJ. Prophylaxis and Treatment of Acute Graft-Versus-Host Disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan 1;43(1):32–41.
39. Gilman AL, Serody J. Diagnosis and treatment of chronic graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1):70–80.
40. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Sorrow M, Diaconescu R, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1993–2003.
41. Locatelli F, De Stefano P. T-cell depletion to prevent GVHD after unrelated-donor marrow transplantation. *The Lancet*. 2005 Aug;366(9487):692–4.
42. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science*. 2002 Mar 15;295(5562):2097–100.

43. Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2011 Dec;3(12):1445–59.
44. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*. 2011 Jan 7;331(6013):44–9.
45. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 2016 Apr;39:82–9.
46. Sophie caillat Zuckmann, Eric Vivier, Gilles Thibaut. Lymphocytes NK(Natural Killer).
47. Functions of natural killer cells : Article : Nature Immunology [Internet]. [cited 2016 Aug 24]. Available from: <http://www.nature.com/ni/journal/v9/n5/full/ni1582.html>
48. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of NK cell development. *Trends Immunol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Nov 1];34(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852183/>
49. Dulphy N, Chrétien A-S, Khaznadar Z, Fauriat C, Nanbakhsh A, Caignard A, et al. Underground Adaptation to a Hostile Environment: Acute Myeloid Leukemia vs. Natural Killer Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Mar 9 [cited 2016 Aug 23];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4783386/>
50. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset | *Blood Journal* [Internet]. [cited 2016 Aug 24]. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/97/10/3146.long?sso-checked=true>
51. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633–40.
52. Cooper MA. Teach Your NK Cells Well. *Immunity*. 2016 Aug 16;45(2):229–31.
53. Orr MT, Lanier LL. Natural Killer Cell Education and Tolerance. *Cell*. 2010 Sep 17;142(6):847–56.
54. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990 Jul;11(7):237–44.
55. Diefenbach A, Raulet DH. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*. 2001 Jul 1;181(1):170–84.
56. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 1];31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868343/>
57. Asma Beldi-Ferchiou. Etude des mecanismes regulateurs des cellules NK : rôle de la molecule PD-1 et de la prostaglandine E2 (PGE2). 2015.
58. Ruggeri L, Mancusi A, Burchielli E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation. *Cytotherapy*. 2006;8(6):554–8.
59. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):1935–47.

60. NK cell regulation of T cell-mediated responses [Internet]. [cited 2016 Aug 24]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589004003001>
61. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*. 1991 Apr 1;173(4):1017–20.
62. Obeidy P, Sharland AF. NKG2D and its ligands. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Dec;41(12):2364–7.
63. Van Belle TL, von Herrath MG. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol Immunol*. 2009 Nov;47(1):8–11.
64. Spear P, Wu M-R, Sentman M-L, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immunol [Internet]*. 2013 May 1 [cited 2016 Jun 13];13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3700746/>
65. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413–41.
66. Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance. *Cancer Res*. 2006 Jan 1;66(1):563–70.
67. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12445–50.
68. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol*. 2006 Jun;18(3):151–8.
69. Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, et al. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Mar;13(3):298–307.
70. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibia J, Bahram S. In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS ONE [Internet]*. 2007 Jun 13 [cited 2016 Dec 14];2(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1885219/>
71. Wang WY, Tian W, Zhu FM, Liu XX, Li LX, Wang F. MICA, MICB Polymorphisms and Linkage Disequilibrium with HLA-B in a Chinese Mongolian Population. *Scand J Immunol*. 2016 Jun;83(6):456–62.
72. Fernández-Messina L, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol [Internet]*. 2012 Sep 25 [cited 2016 Oct 13];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457034/>
73. Mizuki N, Ando H, Kimura M, Ohno S, Miyata S, Yamazaki M, et al. Nucleotide sequence analysis of the HLA class I region spanning the 237-kb segment around the HLA-B and -C genes. *Genomics*. 1997 May 15;42(1):55–66.
74. Boukouaci W, Busson M, Latour RP de, Rocha V, Suberbielle C, Bengoufa D, et al. MICA-129 genotype, soluble MICA, and anti-MICA antibodies as biomarkers of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5216–24.

75. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 2001 Jun;53(4):279–87.
76. Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*. 2001 May;2(5):443–51.
77. Fürst D, Solgi G, Recker K, Mytilineos D, Schrezenmeier H, Mytilineos J. Sequence-based typing of major histocompatibility complex class I chain-related gene A alleles by use of exons 2–5 information. *Tissue Antigens*. 2011 Mar 1;77(3):201–5.
78. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1298–303.
79. Durmanová V, Tirpakova J, Stuchlikova M, Shawkatova I, Kuba D, Sapak M, et al. Characterization of MICA gene polymorphism of HLA complex in the Slovak population. *Ann Hum Biol*. 2011 Sep;38(5):570–6.
80. Isernhagen A, Schilling D, Monecke S, Shah P, Elsner L, Walter L, et al. The MICA-129Met/Val dimorphism affects plasma membrane expression and shedding of the NKG2D ligand MICA. *Immunogenetics*. 2016;68:109–23.
81. Isernhagen A, Malzahn D, Viktorova E, Elsner L, Monecke S, von Bonin F, et al. The MICA-129 dimorphism affects NKG2D signaling and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *EMBO Mol Med*. 2015 Nov;7(11):1480–502.
82. Boukouaci W, Al-Daccak R, Dulphy N, Lauden L, Amokrane K, Fortier C, et al. Soluble MICA-NKG2D interaction upregulates IFN- γ production by activated CD3-CD56+ NK cells: potential impact on chronic graft versus host disease. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1536–41.
83. Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cells as a therapeutic tool in mismatched transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2004 Sep;17(3):427–38.
84. Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien SJ, Carrington M. Diversity of MICA and Linkage Disequilibrium with HLA-B in Two North American Populations. *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):152–8.
85. Parmar S, del Lima M, Zou Y, Patah PA, Liu P, Cano P, et al. Donor-recipient mismatches in MHC class I chain-related gene A in unrelated donor transplantation lead to increased incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):2884–7.
86. Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M, Poli C, Allard S, Cury S, et al. MICA Variant Promotes Allosensitization after Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013 May 31;24(6):954–66.
87. Pollock RA, Chandran V, Pellett FJ, Thavaneswaran A, Eder L, Barrett J, et al. The functional MICA-129 polymorphism is associated with skin but not joint manifestations of psoriatic disease independently of HLA-B and HLA-C. *Tissue Antigens*. 2013 Jul 1;82(1):43–7.

88. Zhou X, Wang J, Zou H, Ward MM, Weisman MH, Espitia MG, et al. MICA, a gene contributing strong susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2014 Aug;73(8):1552–7.
89. Suemizu H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahram S, et al. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2971–6.
90. Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, et al. Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):481–9.
91. Anderson E, Grzywacz B, Wang H, Wang T, Haagenson M, Spellman S, et al. Limited role of MHC class I chain-related gene A (MICA) typing in assessing graft-versus-host disease risk after fully human leukocyte antigen-matched unrelated donor transplantation. *Blood*. 2009 Nov 19;114(21):4753–4; author reply 4754–5.
92. Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, et al. NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica*. 2009 Oct;94(10):1427–34.
93. Carapito R, Jung N, Kwemou M, Untrau M, Michel S, Pichot A, et al. Matching for the non-conventional MHC-I MICA gene significantly reduces the incidence of acute and chronic GVHD. *Blood*. 2016 Jan 1;blood – 2016–05 – 719070.
94. Fuerst D, Neuchel C, Niederwieser D, Bunjes D, Gramatzki M, Wagner E, et al. Matching for the MICA-129 polymorphism is beneficial in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2016 Dec 29;128(26):3169–76.
95. Askar M, Sobecks R, Wang T, Haagenson M, Majhail N, Madbouly A, et al. MHC Class I Chain-Related Gene A (MICA) Donor-Recipient Mismatches and MICA-129 Polymorphism in Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantations Has No Impact on Outcomes in Acute Lymphoblastic Leukemia, Acute Myeloid Leukemia, or Myelodysplastic Syndrome: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):436–44.
96. Park Y, Cheong J-W, Park MH, Kim MS, Kim JS, Kim H-S. Effect of major histocompatibility complex haplotype matching by C4 and MICA genotyping on acute graft versus host disease in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol*. 2016 Feb;77(2):176–83.