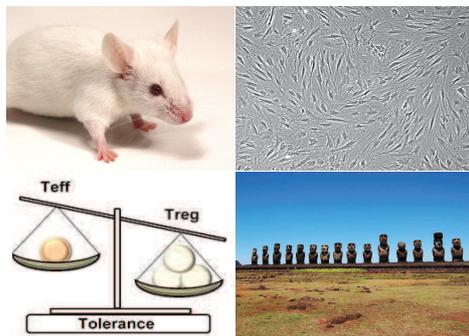


# Impact des cellules stromales mésenchymateuses et de la rapamycine sur la maladie du greffon contre l'hôte xénogénique



Thèse présentée par  
**France BRUCK**  
En vue de l'obtention du grade de  
**Docteur en Sciences  
Biomédicales et  
Pharmaceutiques**

Promoteur: Professeur Yves Beguin  
Co-Promoteur: Docteur Frédéric Baron

Année académique 2013-2014



## Remerciements

*Durant cette thèse, j'ai eu la chance de faire la connaissance de nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et qui m'ont permis de le mener à bien. Au terme de celui-ci, je les en remercie.*

*Merci au Professeur Yves Beguin de m'avoir fait confiance et donné la chance d'effectuer une thèse au sein de son Laboratoire d'Hématologie. Merci pour vos nombreux conseils apportés tout au long de ce travail ainsi que pour le temps que vous avez consacré à sa relecture.*

*Je remercie très particulièrement le Docteur Frédéric Baron. Merci pour la confiance que tu m'as accordé. Tu m'as toujours soutenue, aidée à ne pas baisser les bras dans les nombreuses périodes de doute et encouragée à aller jusqu'au bout de ce travail. Tu as toujours fait preuve d'un grand optimisme tout au long de ma thèse, ce qui m'a permis de me remotiver dans les moments difficiles. Merci pour ta patience (malgré mon « assaillement » de mails;-), ta gentillesse, et pour tout le temps passé à corriger et relire ce travail.*

*Je remercie les différents membres du Laboratoire d'Hématologie et plus particulièrement Alex, pour ta disponibilité, ton soutien, ton aide, pour les nombreux conseils que tu m'as donné ainsi que pour ton franc parler (...). Tu as toujours été un véritable point d'appui sur lequel j'ai pu compter à tout moment durant ma thèse. Merci également pour tous les bons moments que nous avons pu partager; Sophie, pour tes nombreux coups de main et plus particulièrement, pour le temps passé à m'aider à l'animalerie; Amélie, pour les longues heures que tu as passé en zone afin que nous puissions finaliser ce travail; Coline, pour ton aide particulièrement dans l'analyse des TCRs; Stéphanie, pour ton soutien, ta patience, ton aide et pour tous les bons conseils tant théoriques que pratiques que tu as partagé au sein du labo; Ludovic, pour le temps que tu as consacré à la finalité de ce travail; Amélie, Catherine, Marilène, Muriel et Sophie (et ton rire si caractéristique qui apporte énergie et bonne humeur au labo;-), merci les filles pour vos nombreuses marques de gentillesse, d'encouragements et vos paroles réconfortantes.*

*Je tiens à remercier Oli pour les différentes conversations que nous avons pu partager et qui m'ont énormément aidée à traverser certains moments plus difficiles.*

*Je remercie également les différents membres du Laboratoire de Thérapie Cellulaire et Génique et plus particulièrement Chantal et Pascale pour m'avoir permis d'accéder aux cellules souches mésenchymateuses et aux infrastructures du labo ainsi que pour votre aide et gentillesse.*

*Je remercie le Professeur Laurence de Leval pour le temps passé à l'analyse histologique des différents prélèvements murins.*

*Merci à Sandra et Raafat de la plateforme d'Imagerie et de Cytométrie en flux du GIGA pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs nombreux conseils techniques.*

*Agnieszka, Céline F, Eléonore, Jack, Julien, Magali, Marie, Monique, Sandrine, Virginie,... Merci à tous pour votre soutien, votre écoute et pour tous les bons moments que nous avons pu partager... Je tiens à remercier plus particulièrement Céline D et Muriel qui ont toujours été là pour me remonter le moral (...).*

*Je tiens à remercier les docteurs Lagneaux et Norol, les Professeurs Gothot, Louis et Moutschen, le chirurgien Detry et le docteur Lechanteur d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir consacré du temps à la lecture et l'évaluation de ce travail.*

*Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du FNRS, du Télévie, du Fond Léon Fredericq, du Centre Anti-Cancer, du CHU et de l'ULg. Merci à tous.*

*Caro, merci pour ton soutien, ta compréhension et tes encouragements durant cette dernière ligne droite;-).*

*Merci Audrey, Bernard, Cédric, François, Martine, et Valérie pour cette belle amitié que nous partageons depuis plus de dix ans et d'être toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments.*

*Merci Marraine et Jean pour votre générosité et gentillesse. Jean, merci pour le temps que tu as consacré à la relecture de ce travail.*

*Je remercie de tout cœur mes parents sans qui cette thèse n'aurait pu aboutir. Maman, merci de toujours m'avoir soutenue durant mes études et encouragée à aller jusqu'au bout. Mon petit papa, je te remercie de m'avoir donné l'enivie de me lancer dans des études scientifiques et encouragée à persévérer malgré les difficultés. Malheureusement, tu n'auras pas pu assister à la finalité de ce travail mais je pense que tu aurais été fier qu'il soit mené à bien. Merci à vous deux de toujours avoir eu confiance en moi et de m'avoir soutenue dans mes différents choix.*

# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>- 1 -</b>
1. La maladie du greffon contre l'hôte.....	- 1 -
1.1. Généralités.....	- 1 -
1.2. La GVHD aiguë (GVHDA).....	- 1 -
1.2.1. Classification et manifestations cliniques.....	- 1 -
1.2.2. Pathophysiologie.....	- 4 -
(1) Les déclencheurs.....	- 4 -
(2) Les détecteurs.....	- 7 -
(3) Les médiateurs.....	- 8 -
(4) Les effecteurs.....	- 11 -
1.2.3. Fréquence et facteurs de risques.....	- 13 -
1.2.4. Prophylaxie et traitement.....	- 13 -
1.2.4.1. Prophylaxie.....	- 13 -
1.2.4.2. Traitement.....	- 14 -
1.3. La GVHD chronique.....	- 15 -
1.3.1. Classification et manifestations cliniques.....	- 15 -
1.3.2. Pathophysiologie.....	- 16 -
1.3.3. Fréquence et facteurs de risques.....	- 16 -
1.3.4. Traitement.....	- 16 -
1.4. L'effet de la greffe contre tumeur.....	- 17 -
1.5. Les mini-allogreffes.....	- 17 -
1.6. Développement de souris humanisées.....	- 18 -
1.6.1. Historique.....	- 19 -
1.6.2. Les souris immunodéficientes présentant des mutations de l'IL2-R $\gamma$ .....	- 20 -
1.6.3. Limitations des modèles de souris humanisées.....	- 28 -
2. Les cellules souches.....	- 29 -
2.1. Généralités.....	- 29 -
2.2. Les cellules souches hématopoïétiques.....	- 29 -
2.3. Les cellules stromales mésenchymateuses.....	- 30 -
2.3.1. Historique.....	- 30 -
2.3.2. Origine et caractérisation.....	- 30 -
2.3.3. Propriétés immunologiques des CSM.....	- 33 -
2.3.4. CSM et immunomodulation: données <i>in vitro</i> .....	- 33 -
2.3.4.1. CSM et les lymphocytes T.....	- 33 -
2.3.4.2. CSM et les lymphocytes B.....	- 37 -
2.3.4.3. CSM et les cellules NK.....	- 38 -
2.3.5. CSM et immunomodulation : données <i>in vivo</i> .....	- 38 -
2.3.5.1. Maladies auto-immunes.....	- 38 -
2.3.5.2. CSM et la prise de greffe de CSH.....	- 39 -
2.3.5.3. CSM dans le cadre de la prévention et/ou le traitement de la GVHDA.....	- 40 -
2.3.5.4. CSM et études précliniques chez le chien.....	- 43 -
2.3.6. CSM et immunomodulation: études cliniques.....	- 44 -
2.3.6.1. Maladies auto-immunes.....	- 44 -
2.3.6.2. Co-transplantation de CSM dans le cadre d'allogreffes de cellules souches.....	- 45 -
2.3.6.3. CSM et traitement de première ligne de la GVHDA de grade II-IV.....	- 47 -
2.3.6.4. CSM et traitement de la GVHDA réfractaire aux corticostéroïdes.....	- 47 -
2.3.6.5. CSM et traitement de la GVHDC.....	- 49 -
3. Les lymphocytes T régulateurs.....	- 51 -
3.1. Historique.....	- 51 -

3.2.	Origine et développement .....	- 52 -
3.2.1.	Les lymphocytes Treg induits.....	- 53 -
3.3.	Mécanismes d'action immunosuppressive des Treg.....	- 55 -
3.4.	Treg et GVHD: Etudes expérimentales.....	- 56 -
3.4.1.	Treg et agents immunosuppresseurs .....	- 57 -
3.4.2.	Treg et GVHDa xénogénique .....	- 59 -
3.4.3.	Treg et GVHD: Etudes translationnelles .....	- 61 -
3.4.3.1.	Corrélations rétrospectives .....	- 61 -
3.4.4.	Injection de Treg.....	- 62 -
3.4.4.1.	Non amplifiés .....	- 62 -
3.4.4.2.	Amplification <i>ex vivo</i> .....	- 63 -
3.4.4.3.	Amplification <i>in vivo</i> .....	- 63 -
4.	La rapamycine .....	- 65 -
4.1.	<i>The mammalian Target of Rapamycin</i> (mTOR) .....	- 65 -
4.2.	Activation et rôle de mTOR.....	- 66 -
4.3.	Inhibition de mTOR par la rapamycine.....	- 67 -
4.3.1.	La rapamycine et les lymphocytes T .....	- 67 -
4.3.2.	La rapamycine et les lymphocytes B .....	- 69 -
4.3.3.	La rapamycine et les cellules dendritiques (DC) .....	- 69 -
5.	Objectifs et plan du travail .....	- 70 -
	<b>Section expérimentale Partie I.....</b>	
	<i>Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease.....</i>	<b>- 72 -</b>
	<b>Section expérimentale Partie II.....</b>	
	<i>The mTor inhibitor rapamycin delays xenogeneic graft-versus-host disease (xGVHD) in NSG mice.....</i>	<b>- 97 -</b>
	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>- 111 -</b>
	<b>Références.....</b>	<b>- 120 -</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>- 137 -</b>

## Abréviations

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**ALCAM:** *activated leukocyte cell adhesion molecule*

**AMP:** adénosine monophosphate

**ARN:** acide ribonucléique

**AT:** *adipose tissue*

**ATBM:** *antibody T-cell-depleted bone marrow*

**ATG:** *antithymocyte globulin*

**ATP:** adénosine triphosphate

**Aza:** azacitidine

**BAFF:** *B cell activating factor of the tumor necrosis factor family*

**BLIMP:** *B lymphocyte induced maturation protein*

**BM:** *bone marrow*

**BRG:** BALB/c-Rag1<sup>-/-</sup> ou Rag2<sup>-/-</sup>

**CB:** *cord blood*

**CCL:** *chemokine (C-Cmotif) ligand*

**CCR:** *chemokine (C-Cmotif) receptor*

**CD:** cluster designation

**CFU-F:** *colony-forming units-fibroblasts*

**Chr.:** chromosome

**CIBMTR:** *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*

**CIK:** *cytokine-induced killer*

**CM:** *chorion membrane*

**CMH:** complexe majeur d'histocompatibilité

**COX:** cyclo-oxygénase

**CPA:** cellule présentatrice d'antigène

**CsA:** ciclosporine A

**CSF:** *colony stimulating factors*

**CSH:** cellule souche hématopoïétique

**CSM:** cellule stromale mésenchymateuse

**CTL:** *cytotoxic T lymphocyte*

**CV:** *chorionic villi*

**DAMP:** *damage-associated molecular pattern*

**DC:** *dendritic cells*

**DLA:** *dog leukocyte antigen*

**DLI:** *donor lymphocyte infusion*

**DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle's medium*

**DMSO:** diméthylsulfoxyde

**DNAM:** *DNAX accesory molecule*

**DNA-pk:** *DNA-dependant protein kinase*

**EAE:** *experimental autoimmune encephalomyelitis*

**EBV:** Epstein Barr virus

**EBI3:** *EBV-induced gene 3*

**EGF:** *epidermal growth factor*

**4E-BP:** *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*

**ERK:** *extracellular-signal-regulated kinase*

**FACS:** *fluorescent activated cell sorting*

**FBS:** *fetal bovine serum*

**Fc:** fragment constant

**FK506:** tacrolimus

**FKHR:** *forkhead transcription factor Foxo1*

**FKBP12:** *immunophilin FK506-binding protein 1A, 12 kDa*

**Flt:** *fetal liver tyrosine kinase*

**Foxo:** *forkhead box protein*

**Foxp3:** *forkhead box P3*

**FRB:** *FKBP12-rapamycine-binding domain*

**GC:** *germinatif center*

**G-CSF:** *granulocyte-colony stimulating factor*

**GFP:** *green fluorescent protein*

**GITR:** *glucorticoid-induced tumor necrosis factor family-related gene/protein*

**GM-CSF:** *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

**GrzB/A:** *granzyme B/A*

**GVHD:** *graft-versus-host disease*

**GVL:** *graft-versus-leukemia*

**HAM:** *human amnion membrane*

**HGF:** *transforming growth factor*

**HEAT:** *Huntington, elongation factor 3, PR65/A, TOR*

**HLA:** *human leucocyte antigen*

**IBMTR:** *International Bone Marrow Transplantation Registry*

**ICOSL:** *inducible costimulator ligand*

**IDO:** *indoléamine 2,3-dioxygénase*

**IFN:** *interféron*

**Ig:** *immunoglobuline*

**IGF:** *insulin like growth factor*

**IL:** *interleukine*

**ILT:** *immunoglobulin-like transcript*

**i.p:** *voie intrapéritonéale*

**IPEX:** *immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrom*

**IRF:** *interferon regulatory factor*

**ISCT:** *International Society for Cellular Therapy*

**ITAM:** *immunoreceptor tyrosine based activation motif*

**i.v:** *voie intraveineuse*

**KIR:** *killer inhibitory receptor*

**Lag3:** *lymphocytes-activation gene 3*

**LLA:** *leucémie lymphoblastique aiguë*

**LLC:** *leucémie lymphoïde chronique*

**LMA:** *leucémie myéloïde aiguë*

**LMC:** *leucémie myéloïde chronique*

**LPS:** *lipopolysaccharide*

**mAb:** *monoclonal antibody*

**MAPK:** *mitogen-activated protein kinase*

**MAPKAP1:** *mitogen-activated protein kinase-associated protein 1*

**M-CSF:** *macrophage colony stimulating factor*

**MIF:** *macrophage migration inhibitory factor*

**MiHA:** *minor histocompatibility antigen*

**MLR:** *mix lymphocytes reaction*

**mLST8:** *mammalian lethal with Sec 13 protein 8*

**MMF:** *mycophénolate mofétil*

**MMP:** *matrix métalloprotéinase*

**mTEC:** *medullary thymic epithelial cell*

**mTOR:** *mammalian target of rapamycin*

**MTX:** *méthotrexate*

**N.S.:** *non significatif*

**NCR:** *natural cytotoxic receptor*

**NF-AT:** *nuclear factor of activated T-cells*

**NF- $\kappa$ B:** *nuclear Factor- $\kappa$ B*

**NIH:** *National Institutes of Health*

**NK:** *natural killer*

**NKR:** *NK cell receptor*

**NLR:** *NOD-like receptor*

**NO:** *oxide nitrique*

**NOD/SCID:** *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*

**NOG:** *NOD-scid IL2r $\gamma$ <sup>null</sup>*

**NOS:** *oxyde nitrique synthase*

**Nrp-1:** *neuropiline-1*

**NSG:** *NOD-scid IL2r $\gamma$ <sup>null</sup>*

**p70S6K1:** *p70 ribosomal S6 kinase 1*

**PAMP:** *pathogen-associated molecular pattern*

**PB:** *peripheral blood*

**PBL:** *peripheral blood lymphocytes*

**PBMC:** *peripheral blood mononuclear cells*

**PBS:** *phosphate buffered saline*

**PD:** *programmed death*

**PDGF:** *platelet derived growth factor*

**PGE2:** *prostaglandine 2*

**PHA:** *phytohémagglutinine*

**PI3K:** *phosphoinositid-3- kinase*

**PIKK:** *phosphoinositide kinase-related kinase*

**PKC- $\alpha$ :** *protein kinase C alpha*

**PL:** *placenta*

**Poly (I: C):** *polyinosinic: polycytidylic acid*

**Prkdc:** *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*

**Pt.:** *patient*

**Rag:** *recombination activating gene*

**RAPTOR:** *regulatory-associated protein of mTOR*

**REDD 1:** *DNA damage response 1*

**Réf.:** *référence*

**Rheb:** *RAS homolog enriched in brain*

**RHO:** *small GTPase RAS homolog*

**RICTOR:** *rapamycin-insensitive companion of mTOR*

**RLR:** *RIG-like receptor*

**ROR $\gamma$ :** *retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$*

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute medium*

**SCF:** *stem cell factor*

**SCID:** *severe combined immunodeficiency disease*

**SDF:** *stromal cell-derived factor*

**SEM:** *standard error of mean*

**Sf:** *scurfy*

**SLAM:** *signaling lymphocytic activation molecule*

**SLE:** *systemic lupus erythematosus*

**STAT:** *signal transducer and activator of transcription*

**TA:** *température ambiante*

**TBI:** *irradiation corporelle totale*

**T<sub>CM</sub>:** *lymphocyte T central mémoire*

**TCR:** *T cell receptor*

**T<sub>EM</sub>:** *lymphocyte T effecteur mémoire*

**TGF- $\beta$ :** *transforming growth factor- $\beta$*

**T<sub>H</sub>:** *lymphocytes T helper*

**TLR:** *toll-like receptor*

**T<sub>N</sub>:** *lymphocytes T naïfs*

**TNC:** *total nucleated cell*

**TNF:** *tumor necrosis factor*

**TOR:** *target of rapamycin*

**TRAIL:** *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

**Treg:** lymphocyte T régulateur

**TSC:** *tuberous sclerosis complex*

**TSLP:** *thymic stromal lymphopoïétine*

**U:** unité

**UC:** *umbilical cord*

**UGT:** UDP-glucuronosyltransférase

**V(D)J:** *variable diversity and join*

**VCAM:** *vascular cell adhesion molecule*

**WJ:** *Wharton's Jelly*

**WT:** *wild type*

# Introduction



# 1. La maladie du greffon contre l'hôte

## 1.1. Généralités

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement de choix pour certains patients atteints d'hémopathies malignes. Son efficacité dépend largement de la destruction des cellules tumorales du patient par les lymphocytes T présents dans le greffon, qu'on appelle également l'effet de la greffe contre tumeur (GVL pour « *graft-versus-leukemia* »). Malheureusement, ces mêmes lymphocytes sont également responsables d'induire la maladie du greffon contre l'hôte. Couramment désignée par l'abréviation **GVHD** pour « *graft-versus-host disease* », cette maladie est la conséquence de l'activation des cellules immunitaires du donneur (et particulièrement des lymphocytes T) dirigées contre des antigènes spécifiques du receveur par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

En 1966, Bellingham décrit les trois conditions nécessaires au développement de la GVHD (1966):

- ✓ Le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes
- ✓ Histoincompatibilité entre donneur et receveur
- ✓ Incapacité du receveur à fournir une réponse effectrice afin d'éliminer ou d'inactiver les cellules greffées

La GVHD présente deux formes principales: une forme aiguë (GVHDa) et une forme chronique (GHVDC). Classiquement, ces deux formes se distinguent par leur moment d'apparition après greffe (avant ou après le jour 100). Cependant, il a été observé que chez des patients ayant reçu un régime de conditionnement non-myéloablateur, c'est-à-dire ne détruisant pas la moelle osseuse du receveur (**mini-allogreffes**) (Baron and Storb 2006), ou d'intensité réduite pouvaient développer une GVHD de forme aiguë au-delà des 100 jours après greffe. Dès lors, l'Institut National de la Santé (NIH pour « *National Institutes of Health* ») a proposé de classer les deux formes de GVHD en fonction des symptômes cliniques observés plutôt que par des critères de temps.

## 1.2. La GVHD aiguë (GVHDa)

### 1.2.1. Classification et manifestations cliniques

Classiquement la GVHDa peut affecter trois organes: la peau, le foie, et le tube digestif. En 1974, Glucksberg et *al.* ont publié la première classification de la GVHDa modifiée par la suite par Thomas et *al.* en 1975 (**Tableau 1.1**) (Glucksberg, Storb et al. 1974; Thomas, Storb et al. 1975). Cette classification distingue quatre stades (1 à 4) pour chaque organe atteint et quatre grades (I à IV) de la GVHD selon le degré d'atteinte des trois organes cibles.

## -Introduction-

Les patients sont d'abord classés (stade) pour chaque organe atteint en fonction du type de lésions cutanées observées et du pourcentage de surface corporelle atteinte, du taux sérique de bilirubine (mg/dl), et du volume de diarrhée émis par jour. La gradation de la GVHD de ces patients est ensuite effectuée en fonction des organes atteints et de la sévérité des lésions: les grades I à II caractérisent une GVHDA de pronostic favorable; le grade III, une GVHDA de pronostic réservé; et le grade IV, une GVHDA qui est souvent mortelle (Glucksberg, Storb et al. 1974).

Stade	Peau	Foie (Bilirubine en mg/dl)	Tube digestif (Diarrhée en ml/jour)
Stade 1	Rash maculopapuleux qui atteint < 25% de la surface corporelle	2 à < 3	> 500
Stade 2	Rash maculopapuleux qui atteint 25% à 50% de la surface corporelle	3 à < 6	> 1000
Stade 3	Rash maculopapuleux qui atteint >50% de la surface corporelle	6 à < 15	> 1500
Stade 4	Erythrodermie généralisée avec desquamation et formations bulleuses	≥ 15	Douleurs abdominales sévères, saignement digestif, et iléus
Grade	Peau	Foie	Tube digestif
I	Stade 1-2	/	/
II	Stade 3 et/ou	Stade 1 et/ou	Stade 1
III	Stade 3 et/ou	Stade 2-3 et/ou	Stade 2-3
IV	Stade 4 et/ou	Stade 4 et/ou	Stade 4

*Tableau 1.1: Classification de la GVHDA proposée par Glucksberg en 1974 et modifiée par Thomas et al. en 1975 (Glucksberg, Storb et al. 1974; Thomas, Storb et al. 1975).*

En 1994, cette classification a été réactualisée lors d'une conférence de consensus sur la gradation de la GVHDA. Au cours de cette conférence, les différentes études cliniques des 20 dernières années ayant utilisé les critères de classification de Glucksberg ont été passées en revue. L'analyse des résultats obtenus a montré que les patients atteints de la GVHDA de stade 1 pouvaient présenter en plus des diarrhées, des nausées persistantes. Cette nouvelle donnée a permis de modifier la classification de Glucksberg en apportant une nouvelle donnée concernant les atteintes gastro-intestinales (Przepiorka, Weisdorf et al. 1995).

## -Introduction-

En 1997, le registre international de transplantation de moelle osseuse (IBMTR pour « *International Bone Marrow Transplantation Registry* ») a développé un index de sévérité regroupant les patients atteints de la GVHDA en 5 catégories allant de 0 à D en se basant sur la classification de Glucksberg permettant de prédire les risques de mortalité après greffes allogéniques (**Tableau 1.2**) (Rowlings, Przepiorka et al. 1997).

Index	Peau		Foie		Intestin	
	Stade	Pourcentage de surface corporelle atteinte par le rash	Stade	Bilirubine (mg/dl)	Stade	Diarrhée (ml/jour)
<b>0</b>	0	0	0	< 1	0	0
<b>A</b>	1	< 25	0	1 à < 2	0	< 500
<b>B</b>	2	25-50	1-2	2 à < 6 ou	1-2	500-1500
<b>C</b>	3	> 50	3	6 à < 15 ou	3	> 1500
<b>D</b>	4	Erythrodermie généralisée avec desquamations et formations bulleuses	4	≥ 15	4	> 2000  Douleurs sévères et occlusions intestinales (iléus)

*Tableau 1.2: Index de sévérité de la GVHDA proposé par l'IBMTR (Rowlings, Przepiorka et al. 1997).*

Histologiquement, les lésions retrouvées sont caractérisées:

- Au niveau de la peau: par la présence d'une apoptose des cellules de l'épiderme, d'une dyskératose, et d'une infiltration lymphocytaire dans l'épiderme et le derme.
- Au niveau du tube digestif: par la présence de corps apoptotiques à la base des cryptes, de la présence d'abcès cryptiques, et d'une desquamation de l'épithélium.
- Au niveau du foie: par la présence d'une apoptose des cellules de l'épithélium, d'une inflammation et d'une destruction des canaux biliaires, et d'une infiltration lymphocytaire autour des espaces portes et des vaisseaux sanguins.

### 1.2.2. Pathophysiologie

La GVHDA est un processus complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et molécules inflammatoires ayant des effets bien distincts, antagonistes et/ou synergiques. Selon Paczesny et al. les différents intervenants dans la GVHDA peuvent être catégorisés en 4 groupes: **(1) Les déclencheurs** qui comprennent la disparité antigénique entre donneur et receveur **(a)** et les dommages tissulaires engendrés par le régime de conditionnement (chimiothérapie et/ou radiothérapie) et la maladie sous-jacente **(b)**; **(2) Les détecteurs** (« *sensor* ») dont les principaux détecteurs dans la GVHDA sont les CPA qui présentent les alloantigènes aux médiateurs; **(3) Les médiateurs** qui représentent les différentes sous-populations de lymphocytes T (naïfs, mémoires, régulateurs (Treg), et helper 17 (T<sub>H</sub>17)); **(4) Les effecteurs** qui regroupent **(a)** les cellules effectrices telles que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour « *cytotoxic T lymphocytes* ») et les cellules « *natural killer* » (NK) et **(b)** des molécules inflammatoires telles que le facteur de nécrose des tumeurs (TNF pour « *tumor necrosis factor* »), l'interféron (IFN)- $\gamma$ , l'interleukine (IL)-1, et l'oxyde nitrique (NO pour « *nitric oxide* ») (Paczesny, Hanauer et al. 2010).

#### **(1) Les déclencheurs**

##### **a. La disparité antigénique entre donneur et receveur**

Cette disparité peut se trouver soit au niveau des HLA pour « *human leukocyte antigen* » soit au niveau des MiHA pour « *minor histocompatibility antigen* ». Les molécules HLA sont encodées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisé sur le bras court du chromosome 6. Les molécules HLA sont catégorisées en 2 grands groupes: les HLA de classe I (A, B, et C) qui sont exprimées par toutes les cellules nucléées de façon variable et les HLA de classe II (DR, DQ, et DP) qui sont exprimées principalement par les cellules hématopoïétiques (les lymphocytes B, les cellules dendritiques (DC), et les monocytes). L'expression des HLA de classe II peut être induite sur d'autres types cellulaires dans certaines conditions telles que lors de dommages tissulaires ou dans un environnement pro-inflammatoire. Lors d'une greffe allogénique, une incompatibilité entre les molécules HLA de classe I et classe II du donneur et celles du receveur est associée à diverses réactions immunologiques médiées principalement par les lymphocytes T du donneur (GVHD) ou les lymphocytes T et les NK du receveur (rejet de greffe). L'incidence de la GVHDA est directement corrélée avec le niveau d'incompatibilité HLA entre donneur et receveur.

Malgré une compatibilité HLA entre donneur et receveur,  $\pm$  40% des patients qui reçoivent une greffe HLA identique développent une GVHDA due à des incompatibilités au niveau des MiHA. Ces MiHA sont présentés par des molécules du CMH de classe I ou de classe II. Les gènes codants pour les MiHA se situent sur divers chromosomes, ce qui explique leur transmission autosomique ou

gonosomique. Par exemple, l'antigène H-Y n'est exprimé que par les hommes puisque le gène qui le code est localisé sur le chromosome Y. Certains MiHA tels que le H-Y, le HA-3, le HA-8, et l'UGT2B17 (UDP-glucuronosyltransférase 2B17) ont une expression ubiquitaire et sont la cible à la fois de la GVHD et de la GVL. D'autres MiHA tels que le HA-1 et le HA-2 sont exprimés principalement par les cellules hématopoïétiques (et les cellules leucémiques) et sont plus les cibles de l'effet GVL que de la GVHD (Rezvani and Barrett 2008).

**b. les dommages tissulaires engendrés par le régime de conditionnement (chimiothérapie et/ou radiothérapie) et la maladie sous-jacente**

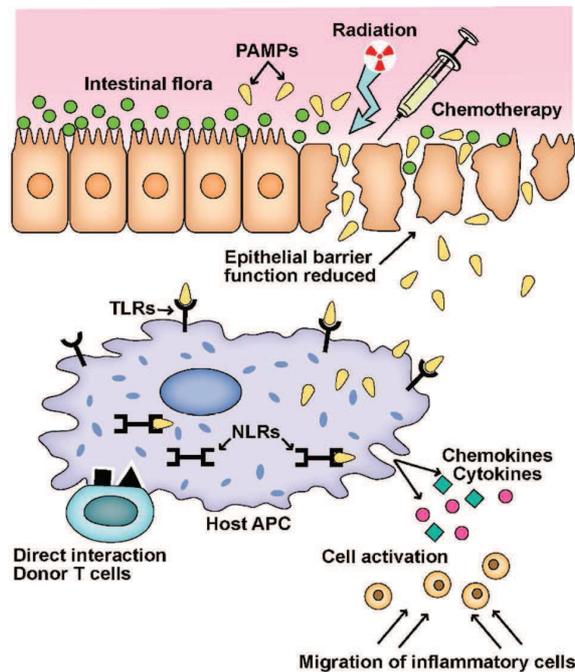
La réponse immunitaire innée joue un rôle important dans l'induction du développement de la GVHDa. Les PRRs pour « *pattern recognition receptors* » ont un rôle essentiel dans l'immunité innée par reconnaissance de microorganismes infectieux tels que: les PAMPs pour « *pathogen-associated molecular patterns* » ou les DAMPs pour « *damage-associated molecular patterns* » (ex.: des protéases, l'adénosine triphosphate (ATP), l'acide urique, des ions,...) (**Figure 1.1**).

Les PRRs sont catégorisés en deux grands groupes:

- Les récepteurs transmembranaires: les TLRs pour « *toll-like receptors* » exprimés par les cellules hématopoïétiques telles que les CPA, les lymphocytes T et B ainsi que par des cellules non hématopoïétiques telles que des cellules endothéliales, épithéliales et les cellules des tissus parenchymateux. Certains TLRs se retrouvent sur la membrane plasmique (TLR-1, -2, -3, -4, -5 et -6) et d'autres sont exprimés sur la membrane des endosomes (TLR -3, -7, -8, et -9). Les TLRs de la membrane plasmique reconnaissent principalement des ligands présents à la surface des pathogènes telles que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes, et la flagelline reconnus par le TLR-4, -2, et -5 respectivement. Les TLRs des endosomes reconnaissent principalement des acides nucléiques tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) reconnus par le TLR-9 et les TLR-3, -7, et -8 respectivement.
- Les récepteurs cytoplasmiques qui comprennent les NLRs pour « *NOD-like receptors* » et les RLRs pour « *RIG-like receptors* » sont exprimés par différents types cellulaires. Les NLRs reconnaissent principalement des composants bactériens et les RLRs des composants viraux.

La stimulation des PRRs par les PAMPs ou les DAMPs engendre une cascade d'activation de molécules intracellulaires conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions tels que le NF- $\kappa$ B pour « *nuclear factor- $\kappa$ B* » et l'IRF pour « *interferon regulatory factor* » -3 et -7, ce qui engendre la transcription de nombreux gènes de l'inflammation (chémokines, molécules d'adhésion et cytokines), de molécules du système HLA et la synthèse d'IFN de type 1 respectivement.

Le rôle de l'interaction PRRs-PAMPs ou DAMPs dans la pathogenèse de la GVHD a été observé lors d'expérimentations réalisées sur des modèles expérimentaux de GVHDa chez des rongeurs. Ferrara et al. ont été parmi les premiers à montrer le rôle important de la reconnaissance du LPS par le TLR-4 dans la pathogenèse de la GVHDa. En effet, le régime de conditionnement (chimiothérapie et/ou radiothérapie) administré avant greffe induit des dommages tissulaires au niveau du tractus gastro-intestinal engendrant la libération de LPS et de microorganismes dans la circulation périphérique. Ceux-ci activent la libération par divers types cellulaires, et notamment par les CPA, de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ainsi que de membres de la famille de l'IFN, initiant le développement de la GVHDa.



**Figure 1.1: Phase d'initiation de la GVHDa.** Le principal élément initiateur de la GVHDa est l'activation des PRRs « *pattern recognition receptors* » tels que les TLRs (« *toll-like receptors* ») et les NLRs (« *NOD-like receptors* ») par des microorganismes infectieux libérés par le tractus gastro-intestinal endommagé par le régime de conditionnement (Penack, Holler et al. 2010).

Ferra et *al.* ont montré dans un modèle murin de GVHDA que l'administration après greffe d'antagonistes du LPS augmentait le temps de survie des souris par comparaison avec des souris non traitées avec cet antagoniste (Cooke, Gerbitz et al. 2001). Cependant, plus récemment, Calcaterra et *al.* ont étudié le rôle du TLR-4 et du TLR-9 dans l'induction de la GVHDA et ont montré dans un modèle murin de GVHDA que les souris déficientes pour le gène codant le TLR-9 avaient un taux de survie plus élevé que les souris WT (pour « *wild type* ») et que les souris déficientes pour le gène codant le TLR-4 (Calcaterra, Sfondrini et al. 2008). Enfin, Li et *al.* ont étudié le rôle des TLRs et de leur signalisation en aval, dans l'induction de la GVHDA. Ils ont observé dans un modèle murin de GVHDA que l'initiation du développement de la GVHDA pouvait se faire indépendamment de l'intervention de la réponse immunitaire innée. En effet, ils ont montré que le blocage de certains PRRs au moment de la greffe allogénique ne prévenait pas l'apparition de la GVHDA (Li, Matte-Martone et al. 2011).

## (2) Les détecteurs

Les CPA et plus particulièrement les DC sont les principaux détecteurs de la GVHDA. Les DC activées par les différentes molécules et cytokines libérées par les tissus endommagés par le régime de conditionnement présentent les antigènes endogènes ou exogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, respectivement dans un contexte CMH I et CMH II. Différents modes de présentation des antigènes existent: une présentation directe, indirecte, croisée ou via un mécanisme d'autophagie (**Figure 1.2**) (Paczesny, Hanauer et al. 2010).

Dans le cas de la présentation directe, les alloantigènes endogènes et exogènes sont présentés par les CPA du receveur aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> du donneur dans un contexte CMH I et CMH II respectivement. Les antigènes exogènes peuvent également être présentés de façon indirecte ou via une présentation dite croisée (« *cross-presentation* »).

Dans le cas de la présentation croisée, les antigènes exogènes sont présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> du donneur dans un contexte CMH I ou CMH II sur les DC du donneur (Shlomchik 2007).

Plus récemment, un autre mode de présentation des antigènes endogènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du donneur dans un contexte CMH II sur les DC du receveur via un mécanisme d'autophagie a été décrit (Munz 2009).

De plus, les CPA fournissent les signaux de co-stimulation (CD80, CD86, ICOSL pour « *inducible costimulator* », OX40L) nécessaires à l'induction de la prolifération, de la sécrétion de cytokines, et l'activation complète des lymphocytes T. *In vivo*, dans des modèles murins de GVHDA, il a été montré que le blocage de l'interaction de certains de ces signaux de co-stimulation, tels que le blocage de la liaison du CD28 ou du CD40 avec le CD80/CD86 ou le CD40L respectivement, diminuait le risque de GVHDA. A l'opposé, le blocage des signaux de co-stimulation dits inhibiteurs tels que le CTLA-4

pour « *cytotoxic T lymphocytes-4* » ou le PD1 pour « *programmed death-1* » augmentait le risque de GVHDa (Blazar, Taylor et al. 1997; Saito, Sakurai et al. 1998; Blazar, Carreno et al. 2003).

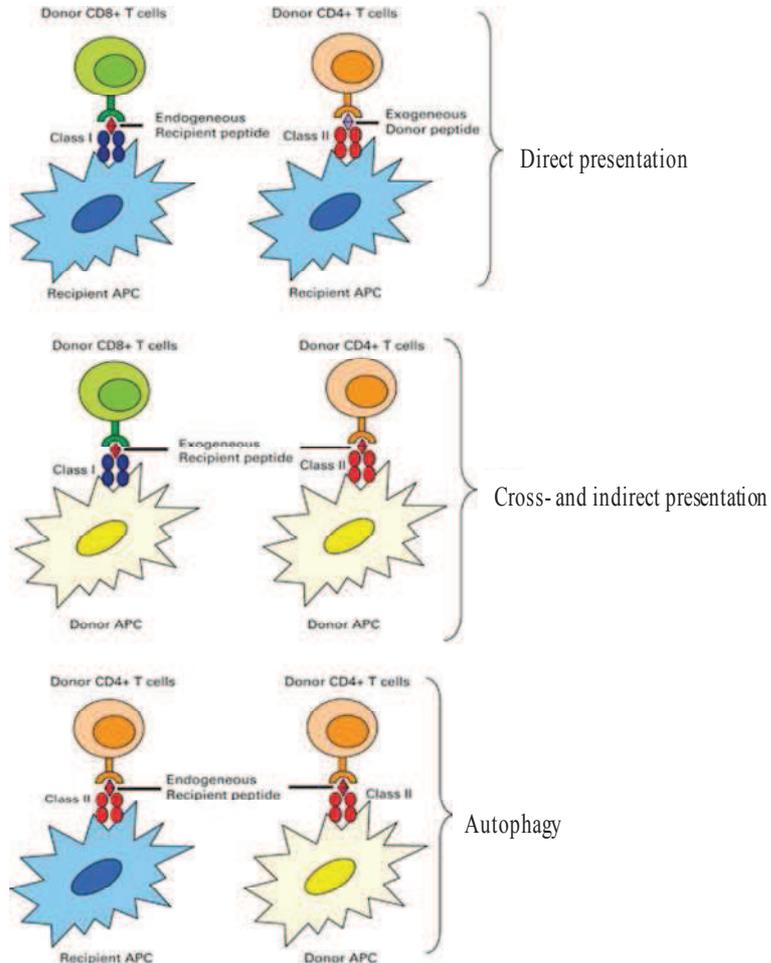


Figure 1.2: Présentation des antigènes exogènes et endogènes par les CPA via une voie directe, croisée ou via un mécanisme d'autophagie (Paczesny, Hanauer et al. 2010).

### (3) Les médiateurs

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> du donneur ont tous deux un rôle majeur dans la pathogenèse de la GVHDa. De par leur capacité à se différencier en lymphocytes T effecteurs T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, et T<sub>H17</sub>, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont particulièrement importants dans l'initiation de la GVHDa.

Les lymphocytes T<sub>H1</sub> et leurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, et le TNF- $\alpha$  sont impliqués dans la pathogenèse de la GVHDa. Cependant, l'effet de ces cytokines dans la pathogenèse de la GVHD est complexe. En effet, pour certaines d'entre elles, leur rôle dépend largement du moment auquel elles apparaissent après greffe allogénique. Par exemple, Brok et al. ont

montré que l'IFN- $\gamma$  a un effet immunosuppresseur quand il apparait directement après greffe allogénique de CSH en induisant l'apoptose des lymphocytes T activés du donneur par un mécanisme Fas/FasL. Par contre, quand il est présent plus tardivement, il a un effet pro-inflammatoire qui par conséquent augmente la sévérité de la GVHDA (Brok, Vossen et al. 1998; Reddy, Teshima et al. 2001). L'IFN- $\gamma$  induit une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, de molécules du système HLA, de Fas, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de chémokines qui favorisent le recrutement de cellules effectrices dans les organes cibles.

L'IL-2 est la principale cytokine sécrétée par les lymphocytes T du donneur. Celle-ci est essentielle à la croissance, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T naïfs en effecteurs. Miyamoto et al. ont été parmi les premiers à montrer que le taux sérique d'IL-2R (récepteur à l'IL-2) soluble ainsi que le taux de TNF- $\alpha$  au jour 3 après greffe allogénique de CSH pouvait prédire le développement de la GVHDA (Miyamoto, Akashi et al. 1996). Par la suite, Mathias et al. ont confirmé la corrélation entre le taux sérique d'IL-2R soluble et le développement et la sévérité de la GVHDA (Mathias, Mick et al. 2000). De nombreuses stratégies thérapeutiques de la GVHDA consistent en l'utilisation d'agents ciblant la production d'IL-2 (tacrolimus, ciclosporine, et anticorps monoclonaux anti-IL2R (CD25)). Cependant l'IL-2 est également essentielle à la génération et au maintien des lymphocytes T régulateurs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>; Treg) qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire et dans l'induction d'une tolérance périphérique (les caractéristiques et la fonction de cette sous-population de lymphocytes T est plus largement détaillée dans la **section 3**).

Les cytokines de type **T<sub>H</sub>2** telle que l'IL-4 peuvent réduire la GVHDA mais, comme pour l'IFN- $\gamma$ , cet effet dépend du moment de son apparition après greffe allogénique (Fowler and Gress 2000; Leveson-Gower, Olson et al. 2011). Tawara et al. ont montré dans un modèle murin de GVHDA que l'administration de lymphocytes T de souris déficientes pour les gènes codants pour des cytokines de type T<sub>H</sub>2 (IL-4, -5, -9, et -13) augmentait la prolifération des lymphocytes T et par conséquent l'incidence de la GVHDA par comparaison aux souris ayant reçu des lymphocytes T de souris WT (Tawara, Maeda et al. 2008). Cependant, Nikolic et al. ont montré que l'injection de lymphocytes T de souris déficientes pour les facteurs de transcription STAT («*Signal Transducer and Activator of Transcription*») -4 ou STAT-6 (réduisant respectivement la réponse T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2) augmentait l'incidence de la GVHDA par comparaison aux souris ayant des lymphocytes T de souris WT (Nikolic, Lee et al. 2000).

L'absence de conclusion claire sur le rôle des T<sub>H</sub>1 et des T<sub>H</sub>2 dans la pathogenèse de la GVHDA suggère l'intervention d'autres sous-populations de lymphocytes T dans la pathogenèse de la GVHDA.

Les lymphocytes  $T_H17$ , caractérisés par la production d'IL-17A, -17F, -21 et -22 ont également un rôle dans la pathogenèse de la GVHDA. Yi et *al.* ont observé que l'injection de lymphocytes T de souris déficientes pour le gène codant l'IL-17A induisait une augmentation de la différenciation des lymphocytes T  $CD4^+$  naïfs en  $T_H1$  et augmentait l'incidence de la GVHDA (Yi, Zhao et al. 2008). Au contraire, Kappel et *al.* ont montré que la greffe de lymphocytes T de souris déficientes pour le gène codant l'IL-17 diminuait l'incidence de la GVHDA induite par les lymphocytes T  $CD4^+$  (Kappel, Goldberg et al. 2009). De plus Carlson et *al.* ont montré que la greffe de  $T_H17$  différenciés *in vitro* à partir de lymphocytes T naïfs induisait une GVHDA sévère (Carlson, West et al. 2009). Par contre, Iclozan et *al.* ont montré que la délétion du gène codant le facteur de transcription ROR $\gamma$  pour « *retinoic acid receptor-related orphan receptor- $\gamma$*  », essentiel à la différenciation des  $T_H17$ , ne diminuait pas l'incidence de GVHDA (Iclozan, Yu et al. 2010). Ces résultats suggèrent que les  $T_H17$  sont suffisants mais pas indispensables à l'induction de la GVHDA.

L'IL-21 est une autre cytokine sécrétée par les lymphocytes  $T_H17$  qui a un rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes B, des lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$ , des CPA, et dans la maturation ou l'expansion des NK. L'IL-21 augmente également l'activation des  $T_H17$  soit directement soit indirectement en interférant avec l'activité suppressive des  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg (Peluso, Fantini et al. 2007). Bucher et *al.* ont montré que le blocage de la fixation de l'IL-21 à son récepteur (IL-21R) augmentait le temps de survie des souris et diminuait les signes de GVHDA principalement au niveau de l'intestin. Cette diminution était corrélée à une diminution du nombre des lymphocytes T  $CD4^+$  et à une augmentation des Treg dans la muqueuse intestinale (Bucher, Koch et al. 2009). De plus, dans un modèle murin xénogénique de GVHDA, Hippen et *al.* ont montré que l'injection d'anticorps monoclonaux anti-IL-21 réduisait l'incidence de la GVHDA. Ils ont pu observer que cette diminution était accompagnée d'une diminution du nombre des lymphocytes T sécréteurs d'IFN- $\gamma$ , d'IL-17 et de granzyme B, et d'une augmentation du nombre des lymphocytes T  $CD4^+Foxp3^+$ Treg (Hippen, Bucher et al. 2012).

L'IL-6 et le TGF- $\beta$  (en présence ou non d'IL-1, -21, et d'IL-23) sont 2 cytokines impliquées dans la différenciation des lymphocytes T  $CD4^+$  naïfs en  $T_H17$  (Bettelli, Carrier et al. 2006). Symington et *al.* ont été parmi les premiers à montrer qu'un taux élevé d'IL-6 sérique après greffe allogénique était prédictif d'une GVHDA sévère (Symington, Symington et al. 1992). Plus tard, Chen et *al.* ont montré dans un modèle murin que le blocage du récepteur à l'IL-6 réduisait significativement les dommages engendrés par la GVHDA. Cette diminution était corrélée à une diminution du nombre absolu de  $T_H1$  et  $T_H17$  et à une augmentation de la conversion des  $CD4^+Foxp3^-$  en  $CD4^+Foxp3^+$  (Chen, Das et al. 2009). De plus, le polymorphisme génétique du receveur et/ou du donneur de l'IL-6, tout comme l'IL-

$1\ \alpha$ , l'IL-10, l'IFN- $\gamma$ , et le TNF- $\alpha$  a également été associé au risque de développement de GVHDc. (Rozmus and Schultz 2011).

Le TGF- $\beta$  est une cytokine pléiotropique qui possède à la fois une activité immunosuppressive et une activité immunostimulatrice. Tout comme pour l'IFN- $\gamma$ , le rôle du TGF- $\beta$  dans la pathogenèse de la GVHD est complexe et dépend du moment où il apparaît après la greffe allogénique. Banovic et *al.* ont montré dans un modèle murin de GVHDa que lorsque le TGF- $\beta$  était présent directement après la greffe il atténuait la GVHDa, mais quand il apparaissait plus tardivement il induisait la GVHDc (Banovic, MacDonald et al. 2005).

Les lymphocytes **B** jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire humorale, principalement par la production d'anticorps mais également par des mécanismes indépendants de la production d'anticorps tels que par la présentation d'antigènes, la production de cytokines et de chémokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, et MIF pour « *macrophage migration inhibitory factor* ») ainsi qu'en agissant comme des cellules immunorégulatrices via la production de cytokines immunomodulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . L'implication des lymphocytes B dans la pathogenèse de la GVHDa n'est pas claire et reste controversée. Cependant, dans un modèle murin, Shultz et *al.* ont montré qu'une déplétion en lymphocytes B du greffon diminuait l'incidence de GVHDa (Schultz, Paquet et al. 1995). De plus, il a été observé que l'administration de rituximab (un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 exprimé par les lymphocytes B) en pré-greffe était associée à une réduction de l'incidence de GVHDa (Ratanatharathorn, Logan et al. 2009; Arai, Sahaf et al. 2012).

#### **(4) Les effecteurs**

##### **a. Les molécules effectrices**

Les principales molécules inflammatoires impliquées sont l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T, le TNF- $\alpha$  (Piguet, Grau et al. 1987) et l'IL-1 (Abhyankar, Gilliland et al. 1993) produits par les lymphocytes T et les monocytes/macrophages, et le NO produit par les monocytes/macrophages en présence d'IFN- $\gamma$  (Krenger, Falzarano et al. 1996).

Le TNF- $\alpha$  peut-être produit par les cellules du donneur et du receveur et joue un rôle important dans la pathogenèse de la GVHDa. En effet, il active les CPA et favorise la présentation par celles-ci des alloantigènes et recrute les cellules effectrices (les CTL, les cellules NK) dans les organes cibles en induisant la libération de diverses chémokines. Les résultats de différentes études cliniques ont montré une corrélation étroite entre l'augmentation sérique de TNF- $\alpha$  après greffe allogénique de CSH et l'apparition de GVHDa. De plus, d'autres études cliniques ont montré que la neutralisation du TNF- $\alpha$

ou de son récepteur (TNFR1) diminuait significativement l'apparition de la GVHDA (Holler, Kolb et al. 1993; Choi, Stiff et al. 2012).

Par contre, le rôle de l'IL-1 est moins clair. En effet, bien qu'il ait été observé que la neutralisation de l'IL-1 prévenait l'apparition de la GVHDA chez la souris (Ferrara 2002), aucun effet bénéfique de la neutralisation d'IL-1 sur la prévention de la GVHDA n'a été observé dans une étude clinique randomisée menée par Antin *et al.* (Antin, Weisdorf et al. 2002).

### **b. Les cellules effectrices**

Les CTL sont les cellules effectrices majeures de la GVHDA. Elles induisent la mort des cellules cibles par exocytose de protéines lytiques (perforine, granzyme B), par l'utilisation de récepteurs de mort (Fas (CD95)/FasL (CD95L) et TRAIL (« *TNF-related apoptotic-inducing ligand* ») ou par la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ).

Les cellules **NK** sont des cellules effectrices majeures du système immunitaire inné par leur capacité à éliminer les cellules tumorales ou infectées. L'activité cytotoxique des NK stimulée en présence diverses cytokines (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12, et IL-15) est régulée par une balance entre récepteurs (NKR pour « *NK cell receptors* ») inhibiteurs et activateurs. Les récepteurs inhibiteurs (KIRs inhibiteurs, CD94/NKG2A) reconnaissent spécifiquement les molécules du CMH de classe I classiques et sont polymorphiques. La reconnaissance d'une molécule CMH de classe I par ces récepteurs induit un signal négatif qui inhibe l'activation des cellules NK. On n'aura donc pas de lyse des cellules autologues normales qui expriment des molécules CMH de classe I. Par contre, une absence de molécules CMH de classe I (cellules tumorales ou infectées par un virus) déclenche l'activation des cellules NK et la lyse de la cellule cible, on parle de « *missing self* » c'est-à-dire de reconnaissance de l'absence de soi par les récepteurs inhibiteurs. Ruggeri *et al.* ont montré que chaque cellule NK possédait au moins un récepteur inhibiteur pour l'HLA du soi (Ruggeri, Capanni et al. 2002). Après greffe haplo-identique déplétée en lymphocytes T, l'incidence de GVHDA est effondrée en cas de donneurs ayant des NK alloréactifs envers le receveur car ces NK alloréactifs sont capables d'éliminer les CPA du receveur (Ruggeri, Capanni et al. 2002).

Une autre sous-population de cellules co-exprimant des marqueurs de cellules NK et de lymphocytes T, appelées les cellules **NKT** (« *CD4<sup>+</sup> natural killer T* ») peuvent également avoir un effet bénéfique dans la pathogénèse de la GVHDA. En effet, Leveson-Gower *et al.* ont montré récemment dans un modèle murin de greffe allogénique de CSH que l'administration d'une faible dose de cellules CD4<sup>+</sup> NKT au jour 0 diminuait significativement l'incidence de la GVHDA. Cette diminution était liée à la

capacité des cellules NKT d'altérer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sans pour autant diminuer leur prolifération. Le mécanisme par lequel les NKT induirait cette altération serait lié à la sécrétion par les cellules NKT, d'IL-4 (Leveson-Gower, Olson et al. 2011). Plus récemment, Rubio et al. ont démontré une corrélation étroite entre le nombre de NKT dans le greffon et le risque d'apparition de GVHDa (Rubio, Moreira-Teixeira et al. 2012).

### 1.2.3. Fréquence et facteurs de risques

La fréquence moyenne d'apparition de la GVHDa est de 40% mais varie de 10 à 80% en fonction d'un certain nombre de facteurs de risques tels que la compatibilité HLA entre donneur et receveur (qui est le facteur le plus prédictif), le genre du donneur et du receveur (risque accru en cas de transplantation à un receveur masculin d'un greffon d'un donneur féminin), le régime de conditionnement (irradiation corporelle totale ou non; l'administration de globulines anti-thymocyte (ATG pour « *antithymocyte globulin* ») ou non, ...), l'âge du receveur, et le type de prophylaxie utilisé. La source des CSH joue également un rôle majeur. En effet, la fréquence et la sévérité de la GVHDa est moindre lors de greffes de sang de cordon (Rocha, Wagner et al. 2000) et plus élevée lors de greffes de cellules souches du sang périphérique. La GVHDa et ses complications sont responsables de 10 à 30% des décès consécutifs à une greffe allogénique (Deeg 2007).

### 1.2.4. Prophylaxie et traitement

#### 1.2.4.1. Prophylaxie

A ce jour, en dehors de la déplétion en lymphocytes T du greffon (soit *in vitro* soit *in vivo* via l'administration d'ATG), la combinaison d'inhibiteurs de la calcineurine (la ciclosporine A (CsA) ou le tacrolimus (FK506) avec le methotrexate (MTX) ou le mycophénolate mofétil (MMF), deux anti-métabolites, représente la prophylaxie la plus établie pour prévenir la GVHDa.

Les inhibiteurs des calcineurines permettent d'inhiber la production de NF-AT pour « *nuclear factor of activated T-cells* », un facteur de transcription intranucléaire des lymphocytes T. NF-AT induit la transcription de gènes qui codent pour l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ . Son inhibition mène à la suppression de la production de ces cytokines et par conséquent à l'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Cependant, une des limitations majeures de l'utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine dans la prévention de la GVHDa est qu'ils inhibent également l'expansion des lymphocytes Treg qui sont dotés d'une activité immunosuppressive (Zeiser, Nguyen et al. 2006).

La rapamycine (ou sirolimus) est un produit bactérien (*streptomyces hygroscopicus*) découvert dans les années 1970. En 1977, Martel et al. ont démontré le potentiel immunosuppresseur de la

rapamycine, capable d'inhiber la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires via une inhibition de mTOR pour « *mammalian target of rapamycin* » (Martel, Klicius et al. 1977). De plus, contrairement aux inhibiteurs de la calcineurine, la rapamycine n'inhibe pas l'expansion des Treg ni *in vitro* (Battaglia, Stabilini et al. 2005) ni *in vivo* (Battaglia, Stabilini et al. 2006). La rapamycine en combinaison avec d'autres agents immunosuppresseurs est en cours d'étude comme prévention de la GVHDa (Antin, Kim et al. 2003; Cutler, Kim et al. 2004; Cutler, Li et al. 2007; Rodriguez, Nademanee et al. 2010). L'effet de la rapamycine est plus largement détaillé dans **la section 4**.

De par le fait que l'administration d'agents immunosuppresseurs est souvent associée à l'apparition de nombreux effets secondaires, d'autres stratégies thérapeutiques sont à l'étude. Parmi ces stratégies, l'utilisation d'une thérapie cellulaire par cellules stromales mésenchymateuses (CSM) ou Treg, tous deux dotés d'une activité immunosuppressive, est de plus en plus envisagée.

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont des cellules progénitrices multipotentes (Caplan 1991) principalement localisées dans la moelle osseuse. Il a été largement démontré que les CSM étaient capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des lymphocytes T induite par une stimulation antigénique ou mitogénique (Krampera, Glennie et al. 2003) et *in vivo* de prolonger la survie de greffes de peau allogénique chez des primates indépendamment du CMH (Bartholomew, Sturgeon et al. 2002). De par cette activité immunosuppressive, ces cellules représentent un outil de plus en plus envisagé dans la prévention de la GVHD. Cette partie est plus largement détaillée dans **la section 2**.

#### **1.2.4.2. Traitement**

Le traitement de première ligne de la GVHDa consiste en l'administration de hautes doses de corticostéroïdes. Cependant, l'administration de hautes doses de stéroïdes est associée à une incidence significative d'effets secondaires tels que l'hyperglycémie, l'hypertension, les insomnies, la rétention d'eau, des myopathies, et à une augmentation des complications infectieuses, ce qui augmente significativement le taux de morbidité et de mortalité après greffe. De nombreuses recherches ont été menées afin d'utiliser une stratégie thérapeutique efficace autre que l'utilisation de hautes doses de corticostéroïdes, telle que la combinaison de stéroïdes avec d'autres agents thérapeutiques comme l'ATG (Arai, Margolis et al. 2002), des anticorps monoclonaux anti-CD25 (daclizumab) ou anti-CD3, l'étanercept, ou l'influximab, mais aucune n'a montré un avantage par rapport à une corticothérapie seule (Deeg 2007). Cependant, seulement 25% à 41% des patients atteints de GVHDa répondent à un traitement standard par corticostéroïdes (Alousi, Weisdorf et al. 2009). Dans le cas contraire, des traitements dits de seconde ligne doivent donc être envisagés. Actuellement, il n'existe pas d'agent thérapeutique standard dans le traitement de seconde ligne de la GVHDa. Les agents qui peuvent être utilisés dans ce contexte sont le methotrexate, le MMF, la rapamycine, des anticorps monoclonaux

anti-TGF- $\beta$  (influximab), anti-TGF- $\beta$ R (étanercept), anti-CD25 (daclizumab), anti-CD52 (alemtuzumab), ou l'ATG. L'infusion de CSM ou de Treg est également de plus en plus envisagée dans le traitement de la GVHDa (plus largement détaillé dans **les sections 2 et 3**).

### 1.3. La GVHD chronique

#### 1.3.1. Classification et manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la GVHDc peuvent être limitées à un seul tissu ou être disséminées, et rappellent celles observées au cours de maladies auto-immunes (ex.: atteintes sclérodermiques de la peau ou de l'œsophage, lichen, bronchiolite oblitérante, lupus érythémateux, polyarthrite rhumatoïde,...)

En 1980, le groupe de Seattle a proposé de classer la GVHDc en deux formes: la forme limitée et la forme extensive. La **forme limitée** (touchant uniquement la peau sans signe de sclérodermie et/ou le foie) est de pronostic favorable; par contre, la **forme extensive** (touchant de nombreux organes) est de mauvais pronostic (Shulman, Sullivan et al. 1980; Flowers, Kansu et al. 1999). Cependant, cette classification n'était pas très reproductible. Dès lors, en 2005, le NIH a proposé d'affiner les critères de classification de la GVHDc ils ont proposé, dans un premier temps de standardiser les critères de diagnostic de la GVHDc et, dans un deuxième temps, d'établir un nouveau système de notation (score) allant de 0 à 3 qui définit l'étendue et la sévérité de la GVHDc pour chaque organe en prenant en compte l'impact fonctionnel. Dans un troisième temps, ils proposaient de nouvelles directives pour l'évaluation globale de la sévérité de la GVHDc (légère, modérée ou sévère), basées sur le nombre d'organes ou de sites touchés et le degré d'atteinte de ceux-ci (Filipovich, Weisdorf et al. 2005).

Histologiquement, les lésions retrouvées sont caractérisées:

- Au niveau de la peau: par la présence de dépôts de collagène dans le derme et d'une infiltration lymphocytaire périvasculaire.
- Au niveau du foie: par une infiltration lymphocytaire et par la présence de dépôts de collagène autour des canaux biliaires et dans l'épithélium vasculaire, et par la présence de corps apoptotiques dans le parenchyme.
- Au niveau des poumons: par une infiltration lymphocytaire et par la présence de dépôts de collagène périfonchiolaires et périvasculaires.

- Au niveau des glandes salivaires: par la présence d'une infiltration mononuclée périvasculaire et de fibrose.

### 1.3.2. Pathophysiologie

Actuellement, la pathophysiologie de la GVHDc reste encore mal connue en raison de l'absence de modèles expérimentaux permettant de mimer efficacement toutes les caractéristiques de cette pathologie. Cependant, la présence de manifestations cliniques communes à celles fréquemment observées dans les maladies auto-immunes suggère la génération de lymphocytes T et B dits autoréactifs (c'est-à-dire affectant des cibles antigéniques communes au donneur et au receveur) et de lymphocytes T et B alloréactifs (c'est-à-dire dirigés contre des cibles antigéniques présents chez le receveur mais pas chez le donneur).

### 1.3.3. Fréquence et facteurs de risques

La GVHDc apparaît chez 30 à 80% des patients après greffe allogénique, mais, tout comme pour la GVHDA, cette fréquence dépend de nombreux facteurs tels que: la compatibilité HLA entre donneur et receveur, le genre du donneur et du receveur, l'âge du receveur (le risque augmente avec l'âge), la présence d'une GVHDA sous-jacente, et la source des CSH greffées (l'incidence de la GVHDc est accrue en cas de greffe à partir de cellules souches prélevées dans le sang périphérique (qui contiennent 10 fois plus de lymphocytes T) qu'en cas d'allogreffe de moelle, et plus faible en cas de greffe à partir de sang de cordon), le régime de conditionnement (irradiation corporelle totale ou non), l'administration d'ATG ou non (l'incidence de GVHDc diminue après traitement par ATG) et le type de prophylaxie utilisé (Bolanos-Meade and Vogelsang 2008).

### 1.3.4. Traitement

Le traitement de la GVHDc est complexe et long. Dans le cas de la GVHDc modérée à sévère, le traitement principal consiste en l'utilisation de corticostéroïdes durant une longue période (> 6 mois), ce qui peut contrôler environ 50% des cas de GVHDc mais qui est fréquemment associé à des effets secondaires importants (Lee, Vogelsang et al. 2003). En cas de GVHDc réfractaire aux corticostéroïdes, les traitements les plus utilisés sont le MMF, le sirolimus et la photophorèse extracorporelle. D'autres agents sont également de plus en plus envisagés tels que notamment: le rituximab et le tocilizumab, un anticorps monoclonal anti-IL-6R (Drobyski, Pasquini et al. 2011). L'infusion de CSM ou de Treg peut également être envisagée dans le traitement de la GVHDc (plus largement détaillé dans les **sections 2 et 3**).

#### 1.4. L'effet de la greffe contre tumeur

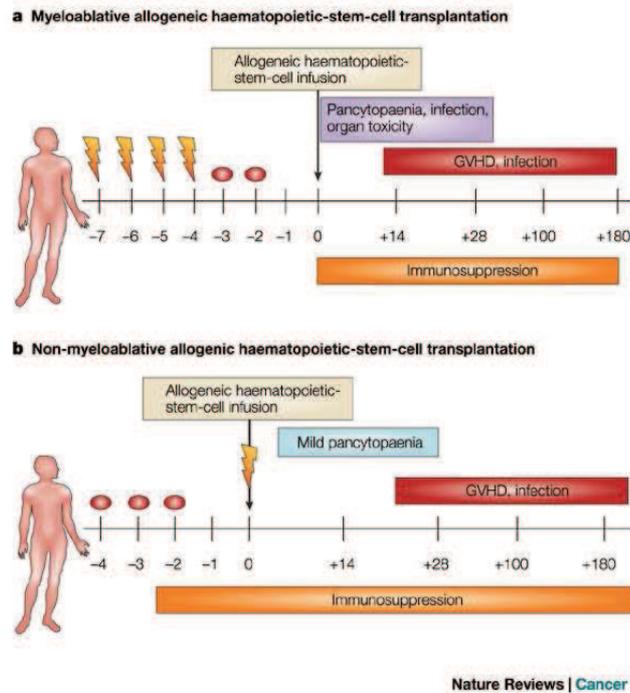
L'effet GVL pour « *graft-versus-leukemia* » a été découvert suite à différentes observations expérimentales et cliniques. En effet, il a été rapporté que lors de greffes syngéniques le taux de rechute était nettement plus élevé que dans le cas de greffes allogéniques (Horowitz, Gale et al. 1990). L'équipe de Thomas à Seattle a quant à elle démontré une diminution du risque de rechute chez les patients qui développaient une GVHD et une augmentation du risque de rechute lorsque les lymphocytes T étaient enlevés du greffon. Cette dernière observation a conduit plusieurs groupes à injecter des lymphocytes du donneur (DLI pour « *donor lymphocyte infusion* ») chez des patients en rechute d'une leucémie après greffe allogénique de CSH (Porter, Collins et al. 2000). Les DLI induisent une rémission complète dans approximativement 65% des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC) et dans 20 à 30% des cas de leucémie myéloïde aiguë (LMA) ou de syndrome myélodysplasique. Cependant, ces DLI peuvent être responsables du développement de complications majeures telles que l'apparition de GVHD aiguë et chronique ou d'une aplasie médullaire transitoire. L'effet GVL est donc intimement lié à l'effet GVH. Tout comme pour la GVHD, les mécanismes impliqués dans le développement de la GVL sont complexes.

Les **MiHA** jouent un rôle majeur dans la balance GVH/GVL. En effet, si les antigènes reconnus par les lymphocytes du donneur sont exprimés à la surface de la majorité des cellules du patient il y aura un effet GVL et une GVH; par contre, si ces antigènes ne sont exprimés que sur les CSH, seul l'effet GVL aura lieu (Dickinson, Wang et al. 2002). MiHA HA-1 et HA-2 sont les MiHA les mieux caractérisés chez l'homme. Ils sont exprimés par les CSH mais également par certaines tumeurs solides (ex.: le cancer du rein). Rezvani et al. ont montré que les CTL d'un donneur HA-1 et HA-2 négatif pouvaient lyser les cellules tumorales du receveur positives pour HA-1 ou HA-2 (Rezvani and Barrett 2008).

#### 1.5. Les mini-allogreffes

Les allogreffes conventionnelles sont associées à une incidence élevée de morbidité et de mortalité liées au traitement lui-même, limitant ainsi leur application à des patients jeunes et en bon état général. Il était donc important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques moins toxiques qui peuvent s'appliquer aux patients âgés et/ou présentant un état général altéré. Cela a conduit plusieurs groupes à développer de nouveaux protocoles d'allogreffe: les mini-allogreffes (**Figure 1.3**). Un des protocoles majeurs de mini-greffe consiste à combiner un conditionnement associant une irradiation corporelle totale de faible intensité (TBI 2 Gy) et de la fludarabine, à un traitement très immunosuppresseur après greffe associant la CsA ou le tacrolimus avec le MMF. Les mini-allogreffes

induisent des rémissions complètes chez 40-50% des patients (Carella, Champlin et al. 2000; Baron, Maris et al. 2005)



**Figure 1.3. Comparaison du régime de conditionnement entre allogreffes conventionnelles et mini-allogreffes. a.** L'allogreffe de CSH avec conditionnement myéloablateur implique l'administration d'une chimiothérapie intensive (ovales) combinée avec une irradiation corporelle totale (éclairs) avant greffe (jour 0). **b.** Pour une mini-allogreffe, le conditionnement non-myéloablateur est associé à de fortes doses d'immunosuppresseurs (Bleakley and Riddell 2004).

## 1.6. Développement de souris humanisées

Une meilleure compréhension de divers processus biologiques humains découle des observations obtenues lors d'études expérimentales effectuées sur des modèles animaux et en particulier chez les rongeurs. Cependant, de nombreux aspects du système biologique, et en particulier du système immunitaire, sont spécifiques d'une espèce à l'autre. Afin de combler le fossé entre les modèles expérimentaux mimant différents processus biologiques humains mis au point chez des rongeurs et ce qui se passe réellement chez l'humain, il a été nécessaire de mettre au point des modèles chez de petits animaux qui récapitulent plus étroitement les systèmes biologiques humains, tels que la mise au point de souris «humanisées».

### 1.6.1. Historique

Le premier modèle murin reconstitué avec des cellules mononuclées du sang périphérique humain (hPBMC) a été mis au point en 1988 par Mosier *et al.* sur des souris SCID pour « *severe combined immunodeficiency* » (Mosier, Gulizia *et al.* 1988). Le syndrome d'immunodéficience combinée sévère ou SCID est un syndrome congénital rare caractérisé par une déficience en lymphocytes T et B. Cette immunodéficience résulte d'une mutation au niveau du chromosome 16. Cette mutation est responsable d'un défaut d'une enzyme, la DNA-PK pour « *DNA-dependent protein kinase* » ou Prkdc pour « *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptid* » intervenant dans la réparation de l'ADN. La déficience de cette enzyme a pour conséquence une jonction anormale des segments géniques des immunoglobulines (Ig) et des récepteurs des lymphocytes T (TCR) au cours de la recombinaison V(D)J pour « *variable diversity and joining* ». Le système immunitaire humoral et cellulaire est donc incapable de réagir face à des antigènes étrangers. Cependant, ce modèle de souris SCID présentait plusieurs désavantages qui limitaient la bonne prise de greffe, tels que le développement de lymphocytes T et B hôtes chez les souris âgées et le maintien de l'activité des cellules NK, des macrophages, et des facteurs du complément (Mosier, Gulizia *et al.* 1988). *In vivo*, la déplétion en cellules NK par l'injection intrapéritonéale (i.p.) d'anticorps anti-NK (ex.: anti-asialo, anti-TM-β1, et anti-NK1.1) (Lazarus, Crow *et al.* 1997; Tournoy, Depraetere *et al.* 1998), la déplétion des granulocytes par des anticorps monoclonaux (Santini, Spada *et al.* 1998) ou encore des macrophages par des liposomes contenant du clodronate (Shibata, Asano *et al.* 1998) ont permis d'augmenter le taux de prise de greffe chez ces souris.

Plus tard, en 1995, Shultz *et al.* ont décrit un autre modèle de souris SCID, les souris dites non-obèses diabétiques SCID (NOD/SCID). Ces souris ont été obtenues par croisement de souris SCID avec des souris NOD. Les souris NOD ont comme caractéristique d'avoir un déficit fonctionnel des NK, une absence de facteurs du complément, et un défaut de différenciation et de fonctionnement des CPA (Shultz, Schweitzer *et al.* 1995). Pendant des années, les souris NOD/SCID ont été un modèle largement utilisé pour l'étude de la reconstitution hématopoïétique après greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines (Hesselton, Greiner *et al.* 1995; Greiner, Hesselton *et al.* 1998; Yoshino, Ueda *et al.* 2000). Bien que ces souris présentent une meilleure prise de greffe par rapport aux souris SCID, leur activité NK résiduelle et leur durée de vie réduite due au développement de lymphomes limitent leur utilisation. Toutefois comme pour les souris SCID, l'injection i.p. d'anti-NK a permis d'augmenter les prises de greffes. En effet, Yoshino *et al.* ont montré que l'injection i.p. d'anti-asialo GM1 à des souris greffées avec des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical augmentait significativement le pourcentage de chimérisme de cellules humaines CD45<sup>+</sup> (hCD45<sup>+</sup>) dans la moelle

osseuse de souris NOD/SCID par rapport aux souris non traitées (45.3% vs. 4.7% respectivement) (Yoshino, Ueda et al. 2000).

Les souris NOD/SCID ont également été largement utilisées dans l'induction d'une GVHDA xénogénique en injectant en i.p. des hPBMC. Cependant, l'induction d'une GVHDA nécessitait une TBI à 3 Gy, l'injection d'anti-NK, et l'injection d'un grand nombre de hPBMC ( $50 \times 10^6$ ). Toutes ces souris mouraient de GVHDA 4 semaines après greffe (Sandhu, Gorczynski et al. 1995).

Les souris NOD-SCID déficientes (« knock-out ») pour le gène codant la microglobuline- $\beta 2$  ( $\beta 2\text{-m}^{\text{null}}$ ) constituent un autre modèle de souris SCID plus immunodéficientes que les souris NOD/SCID. La microglobuline- $\beta 2$  étant un composant du CMH de classe I, les souris déficientes pour ce gène ont une absence d'expression du CMH de classe I et un déficit fonctionnel des cellules NK. Dans l'étude de la reconstitution immunitaire, Kollet et al. ont montré que le taux de prise de greffe après injection intraveineuse (i.v.) de cellules  $\text{CD34}^+$  de sang de cordon ombilical était 11 fois plus élevé chez les souris NOD/SCID- $\beta 2\text{-m}^{\text{null}}$  par rapport aux souris NOD/SCID (Kollet, Peled et al. 2000).

Ces souris ont également été utilisées dans l'induction d'une GVHDA xénogénique. Cependant, le développement d'une GVHDA xénogénique chez la souris NOD/SCID- $\beta 2\text{-m}^{\text{null}}$  dépend fortement de la TBI administrée et du mode d'injection des hPBMC. En effet, Nervi et al. ont montré que seulement 59% des souris irradiées à 2.5 Gy un jour avant la greffe retro-orbitale de  $10 \times 10^6$  hPBMC développaient une GVHDA et aucune ne développait de GVHDA lorsque les  $10 \times 10^6$  hPBMC étaient injectées dans la veine de la queue. A une dose d'irradiation de 3 Gy, 100% des souris greffées en retro-orbital avec  $10 \times 10^6$  hPBMC développaient une GVHDA xénogénique caractérisée par une perte de poids de  $> 20\%$  (Nervi, Rettig et al. 2007).

### **1.6.2. Les souris immunodéficientes présentant des mutations de l'IL2-R $\gamma$**

Au milieu des années 2000, l'émergence de souris immunodéficientes présentant des mutations du gène codant la chaîne  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2 (IL-2R $\gamma$  ou CD132) a permis de lever de nombreuses limitations rencontrées dans les modèles précédents. Les mutations du gène de l'IL2R $\gamma$  empêchent la formation des récepteurs à l'IL-2, -4, -7, -9, -15, et -21 essentiels au développement des lymphocytes T, B, et des NK, engendrant dès lors une absence de cellules NK, de lymphocytes T et B matures, de macrophages, et de facteurs du complément. De plus, ces mutations affectent le développement et l'organisation des organes lymphoïdes secondaires. Ces souris présentent également une durée de vie plus longue que les souris NOD/SCID et NOD/SCID- $\beta 2\text{-m}^{\text{null}}$ , en raison de l'absence de formation de lymphome thymique, suggérant que le développement de ces lymphomes dépend de la signalisation médiée par l'interaction des IL-2R $\gamma$  avec leurs cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ou IL-21) (Shultz, Lyons et al. 2005).

## -Introduction-

Différentes souches de souris immunodéficientes présentant des mutations du gène codant l'IL-2R $\gamma$  ont été développées.

Trois souches principales de ses souris sont actuellement utilisées (**Tableau 1.3**):

- les NOD-scid IL2r $\gamma_c^{\text{null}}$  (NODShi.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Sug</sup>) ou **NOG** (Ito, Hiramatsu et al. 2002).
- les NOD-scid IL2r $\gamma^{\text{null}}$  (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl/Sz</sup>) ou **NSG** (Shultz, Lyons et al. 2005).
- Les BALB/c-Rag (« *recombination activating gene* »)<sup>1-/-</sup> ou BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup> (C.Cg-Rag1<sup>tm1Mom</sup>IL2rg<sup>tm1Sug</sup> ou C.Cg-Rag2<sup>tm1Fwa</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>) ou **BRG** (Traggiai, Chicha et al. 2004; Brehm, Cuthbert et al. 2010).

Nomenclatures des souris immunodéficientes	NOD-scid IL2r $\gamma_c^{\text{null}}$ (NODShi.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tm1Sug</sup> )	NOD-scid IL2r $\gamma^{\text{null}}$ (NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tm1Wjl/Sz</sup> )	BALB/c-Rag1 <sup>-/-</sup> ou BALB/c-Rag2 <sup>-/-</sup> (C.Cg-Rag1 <sup>tm1Mom</sup> IL2rg <sup>tm1Sug</sup> ou C.Cg-Rag2 <sup>tm1Fwa</sup> IL2rg <sup>tm1Wjl</sup> )
<b>Abréviations</b>	NOG	NSG	BRG
<b>Gènes mutés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Prkdc ou DNA-pk sur le chr. 16.</li> <li>➤ IL-2R<math>\gamma_c</math> (« <i>partial deletion</i> ») sur le chr. X.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Prkdc ou DNA-pk sur le chr. 16.</li> <li>➤ IL-2R<math>\gamma</math> (« <i>full deletion</i> ») sur le chr. X.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Rag sur le chr. 1 ou sur le chr. 2.</li> <li>➤ IL-2R<math>\gamma</math> sur le chr. X.</li> </ul>
<b>Caractéristiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Défaut du développement des lymphocytes T et B.</li> <li>➤ Absence de facteur du complément.</li> <li>➤ Défaut dans la différenciation et le fonctionnement des CPA.</li> <li>➤ Présence de NK résiduelles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Défaut du développement des lymphocytes T et B.</li> <li>➤ Absence de facteur du complément.</li> <li>➤ Défaut dans la différenciation et le fonctionnement des CPA.</li> <li>➤ Absence totale de NK.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Défaut du développement des lymphocytes T et B.</li> <li>➤ Absence de facteur du complément.</li> <li>➤ Défaut dans la différenciation et le fonctionnement des CPA.</li> <li>➤ Absence totale de NK.</li> </ul>

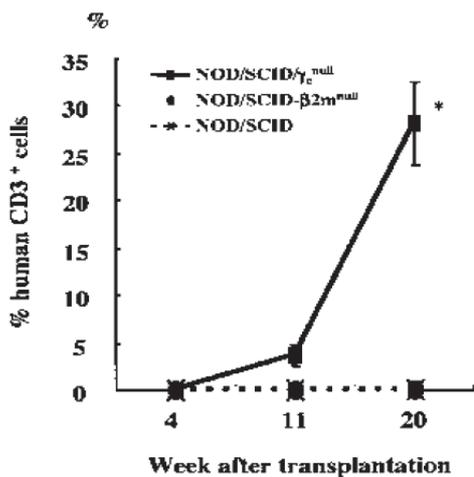
**Tableau 1.3: Caractéristiques des trois souches principales de souris immunodéficientes présentant des mutations du gène codant la chaîne  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2.** **NOD:** « non-obese diabetic »; **scid:** « severe combined immunodeficiency »; **CPA:** cellules présentatrices d'antigènes; **NK:** « natural killer »; **Prkdc ou dna-pk:** « protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide » ou « DNA- dependant protein kinase »; **Rag:** « recombination activating gene »; **IL-2R $\gamma$ :** « interleukin 2-receptor  $\gamma$ -chain »; **IL-2R $\gamma_c$ :** domaine intracellulaire de la chaîne  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2; **chr.:** chromosome.

Ces souches de souris présentent des différences dans leur capacité à supporter la prise greffe de cellules humaines. Plusieurs travaux ont comparé le prise de greffe de CSH dans le cadre de la mise au point d'un système hématopoïétique humain ainsi que la prise de greffe de hPBMC dans le cadre du développement d'une GVHDA entre ces différentes souches de souris immunodéficientes.

En 2003, Hiramatsu et *al.* ont comparé la prise de greffe de  $1 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^4$  cellules hCD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical injectées en i.v. chez des souris NOG avec celle de souris NOD/SCID greffées

avec  $1 \times 10^5$  cellules hCD34<sup>+</sup> en mesurant le pourcentage de hCD45<sup>+</sup> totaux par cytométrie en flux 3 mois et 4 mois après greffe. Les 2 souches de souris ont été préalablement irradiées à 2.4 Gy un jour avant la greffe et les souris NOD/SCID ont reçu en plus une dose d'anti-asialo GM1 quelques heures avant la greffe et tous les 11 jours après greffe. Ils ont montré que le pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans le sang périphérique des souris NOG après 3 mois était plus de 8 fois supérieure à celui des souris NOD/SCID. Après 4 mois, le pourcentage dans la moelle osseuse était de  $73 \pm 6\%$  chez les souris NOG vs.  $11 \pm 4\%$  chez les souris NOD/SCID. Ils ont également observé dans la moelle osseuse et la rate des souris NOG que les différentes sous-populations de lymphocytes humains (les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, les NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, et les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>) étaient présentes.

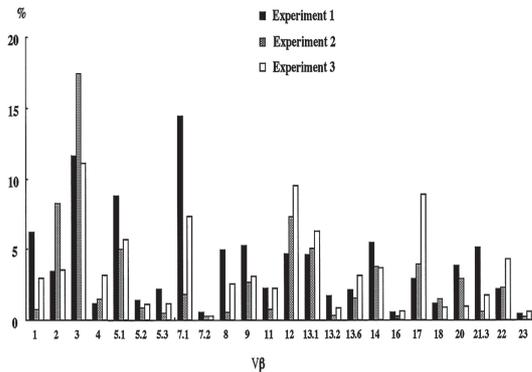
Dans un deuxième temps, les auteurs ont analysé le pourcentage de cellules hCD3<sup>+</sup> dans le sang périphérique de souris NOG, NOD/SCID, et NOD/SCID- $\beta 2m^{\text{null}}$  après greffe i.v. de  $4 \times 10^4$  cellules hCD34<sup>+</sup>. Des cellules hCD3<sup>+</sup> n'étaient observées que chez les souris NOG et leur pourcentage augmentait graduellement au cours du temps (Hiramatsu, Nishikomori et al. 2003) (**Figure 1.4**).



*Figure 1.4: Comparaison du pourcentage de cellules hCD3<sup>+</sup> dans le sang périphérique des souris NOG, NOD/SCID, et NOD/SCID- $\beta 2m^{\text{null}}$  après greffe i.v. de  $4 \times 10^4$  de cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical. Un U test de Mann-Whitney a été utilisé. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM de 2 expériences indépendantes rassemblées ( $n = 3$  dans chaque expérience). \*  $P < .05$  (Hiramatsu, Nishikomori et al. 2003).*

Cette même équipe a également analysé le pourcentage des différentes sous-populations de cellules hCD3<sup>+</sup> dans la moelle, la rate et le thymus chez les souris NOG 5 mois après greffe i.v. de  $4 \times 10^4$  cellules hCD34<sup>+</sup>. Dans le thymus, ils ont observé 2 sous-populations de cellules hCD3<sup>+</sup> (les hCD3<sup>High</sup> et les hCD3<sup>Low</sup>) avec une prédominance de cellules hCD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positives. Dans la moelle et la rate, ils n'ont observé que des cellules hCD3<sup>High</sup> avec une prédominance en hCD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> simple positives et où les TCR des cellules hCD3<sup>+</sup> étaient en majorité de type  $\gamma\delta$ . Dans tous les organes analysés, les cellules hCD3<sup>+</sup> étaient principalement naïves.

De plus, les souris NOG greffées en i.v. avec  $2 \times 10^4$  à  $5 \times 10^4$  cellules hCD34<sup>+</sup> présentaient un répertoire TCR V $\beta$  diversifié dans la rate 4 à 6 mois après greffe (**Figure 1.5**).



*Figure 1.5: Analyse du répertoire TCR Vβ des lymphocytes T de la rate de souris NOG. Quatre à six mois après la greffe i.v. de  $2 \times 10^4$  à  $5 \times 10^4$  cellules hD34<sup>+</sup>, les cellules de rates ont été marquées avec 24 anticorps spécifiques de chaque Vβ et analysées par cytométrie en flux. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et sont représentées (Hiramatsu, Nishikomori et al. 2003).*

En 2009 Ito et al. ont mis au point un modèle de GVHDa xénogénique avec des hPBMC chez des souris NOG préalablement irradiées à 2.5 Gy un jour avant la greffe.

Dans un premier temps, ils ont déterminé la voie d'administration la plus efficace pour l'induction de la GVHDa et ont observé qu'avec  $10 \times 10^6$  hPBMC injectées en i.p. 70% des souris mouraient 1 mois après greffe et 100% dans les 2 mois après greffe. A une dose de  $5 \times 10^6$ , les souris étaient toujours en vie après 2 mois. Lorsque les souris recevaient en i.v.  $2.5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  ou  $10 \times 10^6$  hPBMC, elles mouraient après 1.5 mois, 1 mois ou 2 semaines, respectivement.

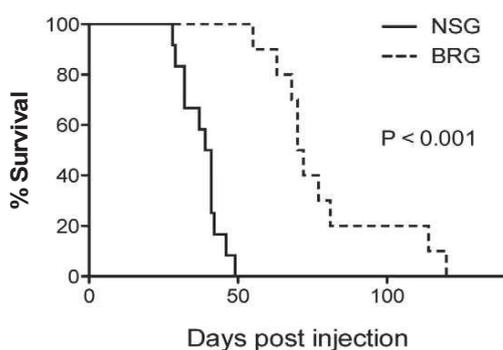
Dans un deuxième temps, ils ont comparé le temps de survie après greffe i.v. de  $10 \times 10^6$  hPBMC chez les souris NOG, NOD/SCID et C57BL/6-RAG2<sup>null</sup> IL2γ<sup>null</sup> préalablement irradiées un jour avant la greffe à 2.5 Gy pour les NOG et à 3.5 Gy pour les 2 autres souches de souris. Ils ont observé que les souris NSG mouraient après 2 semaines et les souris C57BL/6-RAG2<sup>null</sup> IL2γ<sup>null</sup> après 1 à 2 mois. Les souris NOD/SCID quant à elles étaient toujours en vie après 2 mois. Ils ont également comparé le temps de survie de chaque souche de souris sans irradiation préalable. Les souris NOG mouraient après 1.5 à 2.5 mois alors que les souris NOD/SCID et C57BL/6-RAG2<sup>null</sup> IL2γ<sup>null</sup> étaient toujours en vie après plus de 3 mois.

Dans un troisième temps, ils ont comparé par cytométrie en flux le pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans la rate, le sang et la moelle 2 semaines après greffe i.v. de  $5 \times 10^6$  hPBMC chez ces 3 souches de souris préalablement irradiées. Ils ont observé que le pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans la rate, le sang, et la moelle osseuse était beaucoup plus élevé (94.9, 80 et 40.7% respectivement) chez les souris NOG par rapport aux 2 autres souches de souris. Pour les souris NOD/SCID, le pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans la rate, le sang et la moelle était de 1.9, 1.6 et 0.4%, respectivement, et chez les souris C57BL/6-RAG2<sup>null</sup> IL2γ<sup>null</sup> de 48, 13.1 et 0.3%, respectivement. Ils ont également évalué par immunohistochimie, le niveau d'infiltration des cellules hCD45<sup>+</sup> dans le foie, les poumons, et les reins; ils ont pu observer qu'il y avait une infiltration importante de cellules hCD45<sup>+</sup> autour des

vaisseaux dans le foie, les poumons, et les reins des souris NOG et une faible infiltration dans le foie et les poumons des 2 autres souches de souris. Par contre, dans les reins de ces souris ils n'ont observé aucune infiltration de cellules humaines (Ito, Katano et al. 2009). En effet, bien que le foie, les intestins et la peau soient les organes cibles des GVHD allogéniques, le niveau d'infiltration dans les intestins et la peau reste faible dans ce modèle de GVHD xénogénique.

Plus tard, McDermott et *al.* ont comparé notamment le taux de prise de greffe de CSH humaines entre les souris NOG qui ont perdu le domaine intracellulaire du IL2-R $\gamma$  et les souris NSG présentant une déficience complète du IL2-R $\gamma$ . Ils ont montré que 11 à 13 semaines après greffe intrafémorale de  $2.3 \times 10^4$  ou  $3.0 \times 10^4$  cellules CD34<sup>+</sup>, les souris NSG présentaient un pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans la moelle osseuse deux fois plus grand que les souris NOG ( $43.1\% \pm 3.7\%$  vs.  $21.6\% \pm 3.5\%$ , respectivement) suggérant que la présence du domaine extracellulaire de l'IL2-R $\gamma$  chez les souris NOG pouvait affecter négativement leur taux de prise de greffe de CSH humaines (Ito, Hiramatsu et al. 2002). La majorité des cellules hCD45<sup>+</sup> étaient des hCD19<sup>+</sup> (moy.=  $\pm 70\%$  chez les souris NSG vs.  $60\%$  chez les souris NOG) dans les 2 souches de souris. Le taux de cellules hCD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> quant à lui était de  $0.21\% \pm 0.07\%$  pour les souris NSG vs.  $0.04\% \pm 0.02\%$  pour les souris NOG (McDermott, Eppert et al. 2010)

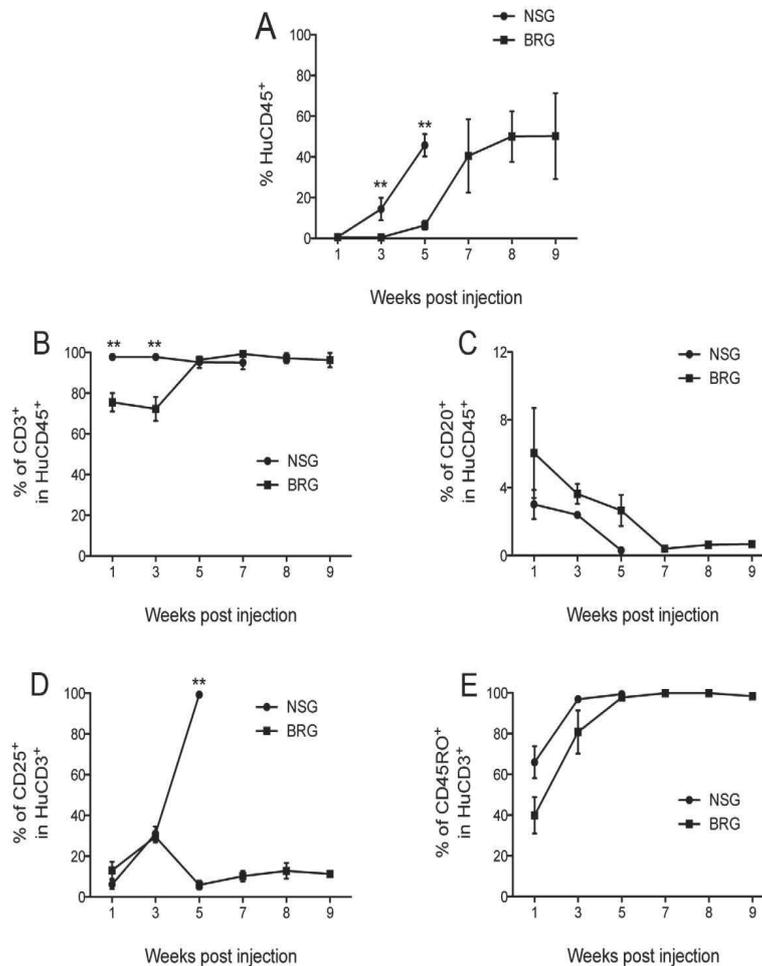
Récemment, Ali et *al.* ont comparé le niveau d'infiltration de cellules humaines après injection i.v. de  $10 \times 10^6$  hPBMC chez des souris NSG et des Balb/c-RAG2<sup>null</sup> IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (BRG). Les deux souches de souris ont développé une GVHDa extensive et la moyenne du temps de survie après greffe était de 40 et 70 jours, respectivement (**Figure 1.6**).



*Figure 1.6: Comparaison du temps de survie des souris NSG et BRG après greffe i.v. de  $10 \times 10^6$  hPBMC. Les souris NSG développaient plus rapidement une GVHDa que les souris BRG avec une médiane du temps de survie de 40 et 70 jours, respectivement, après greffe (Ali, Flutter et al. 2012).*

Après 3 et 5 semaines le pourcentage de cellules hCD45<sup>+</sup> dans le sang périphérique était significativement plus grand chez les souris NSG, avec une majorité de cellules hCD3<sup>+</sup> > 95% vs. < 80% pour les souris BRG. De plus la majorité des cellules humaines exprimaient le CD45RO<sup>+</sup>

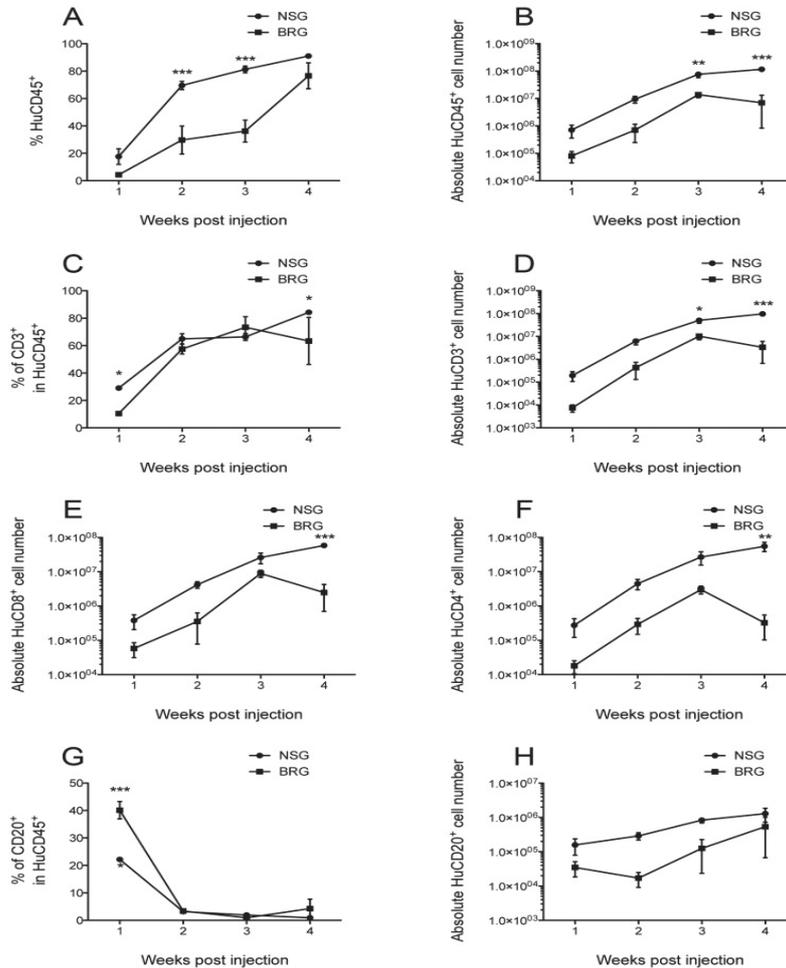
(activées/mémoires) dans les deux souches de souris. Cependant, 5 semaines après greffe, > 90% des cellules hCD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> des souris NSG exprimaient le CD25<sup>+</sup> contre < 10% chez la souris BRG, reflétant un degré d'activation des hCD3<sup>+</sup> plus important chez les souris NSG (**Figure 1.7**).



**Figure 1.7: Analyse cinétique du pourcentage de cellules humaines dans le sang périphérique de souris NSG et BRG après greffe de  $10 \times 10^6$  hPBMC en i.v.** Le sang périphérique a été prélevé deux fois par semaine et les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-humains (A) CD45, (B) CD3, (C) CD20, (D) CD25 et (E) CD45RO et analysées par cytométrie en flux. Un test 2-way ANOVA a été utilisé. Chaque point représente la moyenne du pourcentage de cellules humaines ( $n = 4$  NSG et BRG)  $\pm$  SEM (Ali, Flutter et al. 2012).

Les auteurs ont également évalué le nombre absolu et le pourcentage de cellules humaines dans la rate des souris NSG et BRG toutes les semaines durant 4 semaines. Ils ont observé que tout comme dans le sang périphérique, le pourcentage et le nombre absolu de cellules hCD45<sup>+</sup> étaient plus importants dans la rate des souris NSG comparée à la rate des souris BRG, principalement à cause d'expansion des cellules hCD3<sup>+</sup>. Dans les 2 souches de souris il y avait une accumulation des CD4<sup>+</sup> et des CD8<sup>+</sup> mais qui était plus importante dans les souris NSG. De plus, le pourcentage de cellules hCD20<sup>+</sup> diminuait

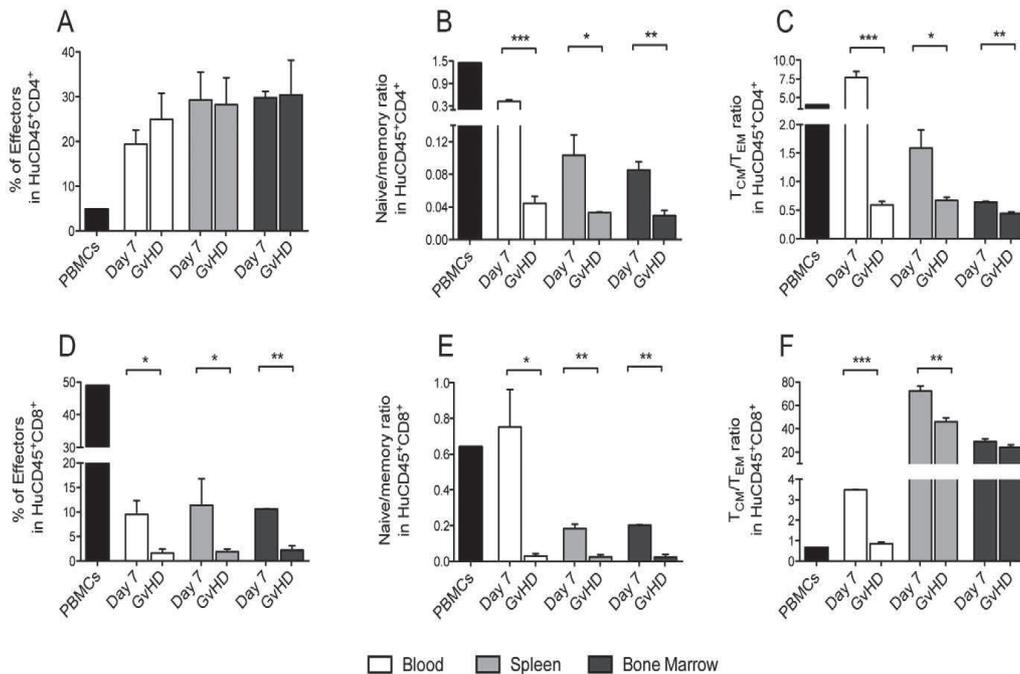
au cours du temps, reflétant une expansion massive des cellules hCD3<sup>+</sup>; mais par contre, le nombre absolu de cellules hCD20<sup>+</sup> augmentait au cours du temps et cette augmentation était plus importante dans les souris NSG (**Figure 1.8**).



**Figure 1.8:** Analyse cinétique du pourcentage de cellules humaines dans la rate de souris NSG et BRG après greffe de  $10 \times 10^6$  hPBMC en i.v. Les rates ont été prélevées chaque semaine durant 4 semaines et les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-humain: (A) CD45, (C) CD3, et (G) CD20 et analysées par cytométrie en flux. Le nombre absolu de cellules humaines (B) CD45, (D) CD3, (E) CD8, (F) CD4, et (H) CD20 de la rate à également été évalué. Un test 2-way ANOVA a été utilisé. Chaque point représente la moyenne du pourcentage de cellules humaines ou du nombre absolu (NSG, n = 4-5 et BRG, n = 4 au jour 7 à 21 ou n = 2 au jour 28)  $\pm$  SEM de 2 expériences indépendantes rassemblées (Ali, Flutter et al. 2012).

Au moment de l'autopsie, les auteurs ont analysé le pourcentage de lymphocytes humains dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate, et le sang périphérique des 2 souches de souris. Dans les 4 organes analysés, ils n'ont pas observé de différence pour le pourcentage de cellules hCD3<sup>+</sup> parmi les cellules hCD45<sup>+</sup> totales entre les 2 souches de souris. Cependant, ils ont observé une différence du pourcentage de cellules hCD20<sup>+</sup> parmi les cellules hCD45<sup>+</sup> totales, qui était plus élevé

chez les souris NSG que chez les souris BRG dans les 4 organes analysés. Ils ont également caractérisé les sous-populations de lymphocytes T dans la moelle osseuse, la rate et le sang de souris NSG irradiées à 2.4 Gy un jour avant la greffe de  $10 \times 10^6$  hPBMC, et cela au jour 7 et au moment de la mort (moyenne du temps de survie = 14 jours). Le pourcentage de lymphocytes T effecteurs (hCD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) parmi les cellules hCD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> totales était semblable au jour 7 et au moment de la mort, mais le pourcentage des lymphocytes T effecteurs (hCD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) parmi les cellules hCD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> totales était statistiquement diminué au moment de la mort. Le rapport de lymphocytes T naïfs/mémoires parmi les cellules hCD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> et les hCD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> totales était statistiquement diminué et le rapport hCD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (T<sub>CM</sub> = lymphocytes T centraux mémoires)/hCD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (T<sub>EM</sub> = lymphocytes T effecteurs mémoires) au moment de la mort était diminué dans les 4 organes analysés pour les cellules hCD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et seulement dans la rate et le sang pour les cellules hCD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (**Figure 1.9**) (Ali, Flutter et al. 2012).



**Figure 1.9:** Analyse du pourcentage de cellules humaines dans la moelle osseuse, la rate, et le sang de souris NSG irradiées à 2.4 Gy un jour avant la greffe de  $10 \times 10^6$  hPBMC. Au jour 7 et au moment de la mort, les sous-populations de lymphocytes T ont été quantifiées par cytométrie en flux: (**A et D**) lymphocytes T effecteurs CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, (**B et E**) le rapport lymphocytes T naïfs (CD45RO<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) sur lymphocytes T mémoires (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), et (**C et F**) le rapport lymphocytes T centraux mémoires (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) sur lymphocytes T effecteurs mémoires (CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>). La barre noire représente le phénotype de départ des hPBMC injectées. Un t test non-appareillé a été utilisé. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SEM de 2 expériences indépendantes rassemblées (n = 7) (Ali, Flutter et al. 2012).

### 1.6.3. Limitations des modèles de souris humanisées

Bien que, les souris NSG, de part leur immunodéficiences sévères, représentent la souche de souris la mieux adaptée pour l'étude du système hématopoïétique et immunitaire humain ainsi que pour le développement de maladies mimant des pathologies du système immunitaire humain, de nombreuses limitations persistent dans l'utilisation de ces souris humanisées. Ces limitations sont dues en partie à des différences pour les facteurs de croissance et les cytokines nécessaires au développement du système hématopoïétique et immunitaire entre les souris et les humains. De plus, les déficiences du développement des organes lymphoïdes secondaires des souris immunodéficientes provoquent des défauts dans la maturation de l'affinité, la commutation de classe, et dans la formation de plasmocytes et de lymphocytes B mémoires à partir de lymphocytes B naïfs. Il y a également des différences de molécules de « *homing* » entre la souris et l'homme qui empêchent une migration efficace des cellules humaines chez la souris (Shultz, Brehm et al. 2011).

Plusieurs approches sont actuellement à l'étude pour développer des souris immunodéficientes qui permettent de surmonter ces différentes limitations. Par exemple, citons l'utilisation de souris NSG transgéniques exprimant des facteurs de croissance hématopoïétiques humains (M-CSF (« *macrophage colony-stimulating factor* »), IL-3, GM-CSF, SCF) (Billerbeck, Barry et al. 2011), des souris NSG qui ont perdu (« *knockout* ») les molécules du CMH de classe I et de classe II, ce qui permet de diminuer la réactivité des cellules humaines contre les tissus hôtes (King, Covassin et al. 2009) ainsi que l'administration de protéines recombinantes telles que le BAFF (« *B-Cell Activating Factor of the Tumor Necrosis Factor Family* ») qui permet d'améliorer la maturation de l'affinité et le switch isotypique des IgM en IgG (Schmidt, Appel et al. 2008) et l'IL-15 et l'IL-7 qui favorisent le développement des cellules NK et des lymphocytes T (Huntington, Legrand et al. 2009) ou encore l'administration de vecteurs lentiviraux chez la souris BRG qui permet de délivrer de l'IL-7 humaine qui favorise le développement de lymphocytes T (O'Connell, Balazs et al. 2010).

## 2. Les cellules souches

### 2.1. Généralités

Une cellule souche est une cellule indifférenciée définie par deux caractéristiques fonctionnelles principales: **(1)** la capacité **d'auto-renouvellement** qui leur permet de maintenir un pool de cellules souches identiques; et **(2)** leur aptitude à **se différencier** en plusieurs types de cellules fonctionnelles matures. On distingue plusieurs types de cellules souches selon leur potentiel de différenciation:

Les cellules souches totipotentes: Les cellules souches totipotentes correspondent aux cellules issues des premières divisions de l'ovocyte fécondé. Ces cellules sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme et les seules à permettre le développement complet d'un individu.

Les cellules souches pluripotentes: Les cellules souches pluripotentes peuvent, sous l'influence de signaux spécifiques, se différencier en cellules qui constituent les tissus dérivés des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) Ces cellules ne permettent pas de donner naissance aux tissus extra-embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes: Les cellules souches multipotentes ont un potentiel de différenciation plus réduit que les cellules souches pluripotentes. Elles sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules fonctionnelles matures dérivées d'un seul feuillet embryonnaire. Par exemple, les CSM ont la capacité de se différencier en adipocytes, ostéoblastes, chondrocytes, cellules musculaires lisses ainsi qu'en cellules endothéliales (Delorme, Ringe et al. 2008).

Les cellules souches unipotentes: Les cellules souches unipotentes ne peuvent conduire qu'à un seul type cellulaire différencié. On les appelle également progéniteurs. Ces cellules sont déjà engagées dans une voie de différenciation.

### 2.2. Les cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont à l'origine de toutes les cellules sanguines et du système immunitaire. Ces cellules sont capables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme d'un hôte irradié de façon létale mais elles sont également capables de se greffer et de se différencier chez des receveurs non-irradiés. Les CSH humaines expriment le CD34, CD45, AC133, Thy1 et cKit et sont négatives pour le CD38. Elles sont localisées principalement dans le stroma médullaire mais sont également présentes dans le sang de cordon ombilical ou encore en faible quantité dans le sang périphérique.

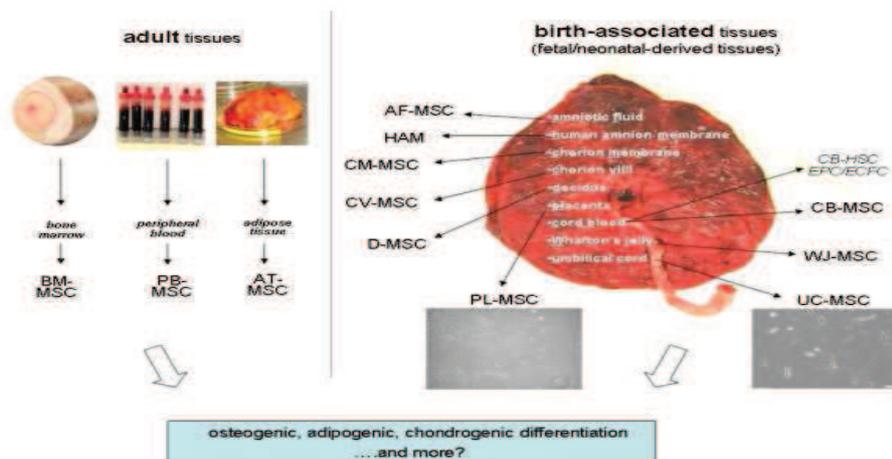
## 2.3. Les cellules stromales mésenchymateuses

### 2.3.1. Historique

Les cellules stromales non-hématopoïétiques de la moelle osseuse ont été initialement identifiées par Friedenstein et ses collaborateurs au cours des années 1960 (Friedenstein, Piatetzky et al. 1966; Friedenstein, Petrakova et al. 1968; Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970). Ceux-ci ont décrit une population de cellules d'aspect fibroblastique, formant des colonies (CFU-F pour « *colony-forming unit-fibroblasts* »), adhérentes au plastique, et capables de se différencier en trabécules osseuses. Suite aux travaux de Friedenstein, de nombreuses études ont montré que ces cellules stromales pouvaient également se différencier en d'autres cellules d'origine mésodermique et non-mésodermique (Makino, Fukuda et al. 1999; Pittenger, Mackay et al. 1999; Oswald, Boxberger et al. 2004; Wang, Kim et al. 2005; Li, Wang et al. 2010). En 1991, Caplan a introduit le terme de cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour définir ces cellules progénitrices multipotentes (Caplan 1991).

### 2.3.2. Origine et caractérisation

La moelle osseuse est la principale source des CSM où elles représentent 0.001-0.01% des cellules mononuclées totales.



**Figure 2.1. Principales sources des cellules souches mésenchymateuses (CSM).** Chez l'adulte, les CSM ont trois origines principales: la moelle osseuse (**BM** pour « bone marrow »), le sang périphérique (**PB** pour « peripheral blood ») et le tissu adipeux (**AT** pour « adipose tissue »). Chez le nouveau-né, les CSM prennent leur origine principalement dans le placenta (**PL** pour « placenta »), le cordon ombilical (**UC** pour « umbilical cord »), le sang de cordon (**CB** pour « cord blood »), et le liquide amniotique (**AF-MSC** pour « amniotic fluid »). Elles peuvent également se trouver dans la membrane amniotique (**HAM** pour « human amnion membrane »), la membrane choriale (**CM** pour « chorionic membrane »), les villosités choriales (**CV** pour « chorionic villi »), et dans la gelée de Wharton (**WJ** pour « Wharton's Jelly ») du cordon ombilical (Hass, Kasper et al. 2011).

Chez l'adulte, les CSM peuvent également être isolées à partir d'autres tissus, par exemple à partir du tissu adipeux (Zuk, Zhu et al. 2001) et du sang périphérique (Villaron, Almeida et al. 2004). Chez le nouveau-né, les CSM peuvent être isolées à partir du sang de cordon ombilical (Erices, Conget et al. 2000), du placenta (Igura, Zhang et al. 2004), du liquide amniotique (in 't Anker, Noort et al. 2003), du sang périphérique (Zvaifler, Marinova-Mutafchieva et al. 2000), du foie fœtal (Campagnoli, Garelli et al. 2004), et de la gelée de Wharton (WJ) du cordon ombilical (Anzalone, Lo Iacono et al. 2010; Zeddou, Briquet et al. 2010) (**Figure 2.1**).

L'isolement de CSM à partir d'un prélèvement de moelle osseuse est relativement aisé par une méthode de centrifugation sur gradient de densité. Les cellules mononuclées sont cultivées dans un milieu spécifique et les CSM sont isolées par leur capacité à adhérer au plastique. Ces CSM constituent une population hétérogène de cellules du point de vue de leur morphologie, de leur physiologie et de l'expression d'antigènes de surface.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de marqueur membranaire spécifique des CSM. Cependant, il a été démontré que les CSM de moelle osseuse pouvaient exprimer les antigènes de surface suivants: CD13, CD29, CD44, CD49a, CD71, CD73 (SH3/SH4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2, endogline), CD106 (VCAM-1 pour « *vascular cell adhesion molecule* »), CD120a, CD124, CD146, CD166 (ALCAM pour « *activated leukocyte cell adhesion molecule* »), CD200, CD271, SSEA-4 et Stro-1 (Chamberlain, Fox et al. 2007). Parmi ceux-ci, plusieurs antigènes de surface ont été décrits comme étant précocement exprimés par les CSM de moelle osseuse. Par exemple, Simmons et *al.* ont montré que la sélection de CSM, positives pour le Stro-1, à partir de cellules mononuclées de la moelle osseuse permettait d'obtenir 10 à 20 fois plus de CFU-F qu'à partir de cellules mononuclées totales (Simmons, Gronthos et al. 1994). Bien que le rôle de Stro-1 sur les CSM soit encore mal connu, il a été observé que son expression diminuait dans les cultures à long terme des CSM et que les CSM Stro-1<sup>+</sup> présentaient une capacité de migration plus importante que les CSM Stro-1<sup>-</sup> (Bensidhoum, Chapel et al. 2004). Plus tard, Nasef et *al.* ont montré que les CSM Stro-1 présentaient une activité immunosuppressive plus importante que les CSM Stro-1<sup>-</sup> (Nasef, Zhang et al. 2009).

Le CD271 est un marqueur qui a également été identifié comme précocement exprimé par les CSM de moelle osseuse. Quirici et *al.* ont montré que seules les cellules mononuclées exprimant le CD271<sup>+</sup> présentaient une activité CFU-F. De plus, les CSM purifiées par isolation de cellules mononuclées de moelle osseuse positives pour le CD271<sup>+</sup> présentaient une capacité de prolifération plus grande (1 à 3 log) que les CSM isolées pour leur capacité à adhérer au plastique (Quirici, Soligo et al. 2002). Tout comme pour le Stro-1 et le CD271, le SSEA-4 (Gang, Bosnakovski et al. 2007), le CD200 (Delorme,

Ringe et al. 2008), et le CD49a (VLA- $\alpha$ 5) (Rider, Nalathamby et al. 2007) ont également été décrits comme des marqueurs précocement exprimés sur les CSM médullaires. Par contre, les CSM de moelle osseuse n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux tels que le CD10, CD11b, CD14, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD45, et l'HLA-DR (Chamberlain, Fox et al. 2007).

Néanmoins, la présence de certains de ces antigènes peut changer en fonction de l'origine des CSM, des conditions de culture ou du temps entre deux passages. C'est pourquoi en 2005, la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT pour « *International Society for Cellular Therapy* ») a défini les critères d'identification des cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales mésenchymateuses multipotentes (Horwitz, Le Blanc et al. 2005). Les trois critères d'identification des CSM définis par l'ISCT sont (**Figure 2.2**):

1. Leur capacité à **adhérer au plastique**
2. **Leur phénotype:**
  - Positives ( $\geq 95\%$ ): CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, et CD105<sup>+</sup>
  - Négatives ( $\leq 2\%$ ): CD11<sup>-</sup> ou CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> ou CD79a<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, et HLA-DR<sup>-</sup>
3. Leur capacité à **se différencier** *in vitro* en: adipocytes, chondrocytes, et ostéoblastes

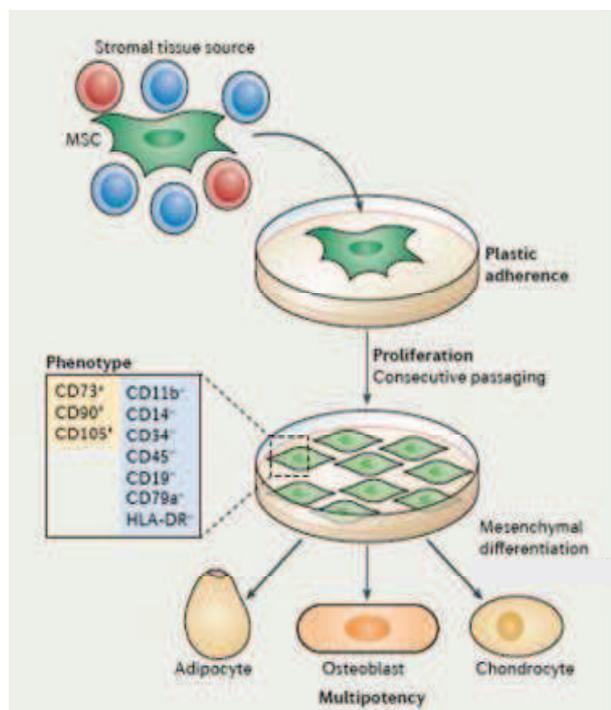
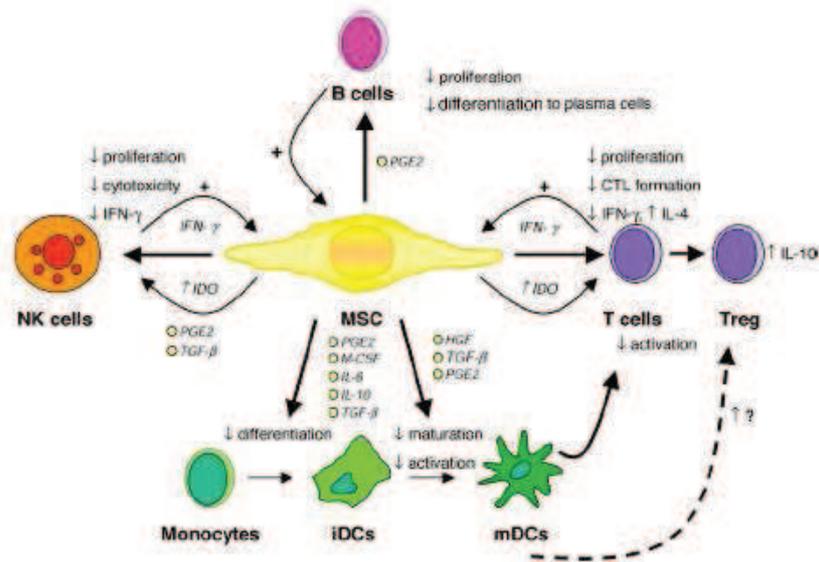


Figure 2.2: Les trois critères d'identification des CSM définis par la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (Le Blanc and Mougiakakos 2012.)

### 2.3.3. Propriétés immunologiques des CSM

Les CSM ne sont pas rejetées par le système immunitaire en cas de greffe allogénique, probablement parce qu'elles sont peu ou pas reconnues par les lymphocytes T. En effet, les CSM n'expriment que faiblement le CMH de classe I et n'expriment pas le CMH de classe II. Néanmoins, les travaux de LeBlanc et *al.* ont montré que l'expression du CMH de classe II pouvait être induite après stimulation par l'IFN- $\gamma$  (Le Blanc, Gotherstrom et al. 2005). De plus les CSM n'expriment pas les molécules de co-stimulations telles que le CD80/CD86 et CD40. Divers travaux menés *in vitro* ont largement démontré la capacité des CSM de moelle osseuse à moduler la prolifération, la différenciation et l'activation de divers types cellulaires (**Figure 2.3**).



**Figure 2.3:** Résumé des effets immunomodulateurs des CSM *in vitro*. CTL: « cytotoxic T lymphocyte »; HGF: « hepatocyte growth factor »; IDO: « indoleamine 2,3-dioxygenase »; PGE2: prostaglandine E2; TGF- $\beta$ : « transforming growth factor  $\beta$  »; iDCs: « immature dendritic cells »; mDCs: « mature dendritic cells »; IL: interleukine; INF: interféron (Nauta and Fibbe 2007).

### 2.3.4. CSM et immunomodulation: données *in vitro*

#### 2.3.4.1. CSM et les lymphocytes T

Les CSM inhibent la prolifération des lymphocytes T induite par une stimulation antigénique (anti-CD3 et/ou CD28) ou mitogénique (phytohémagglutinine (PHA) ou concavaline A). Cet effet s'observe quelle que soit l'origine des CSM (identique au stimulant, au répondant, ou provenant d'un tiers); il n'y a donc pas de restriction immunologique. Cette inhibition est dose-dépendante et porte

aussi bien sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> que sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et aussi bien sur les lymphocytes T naïfs que sur les lymphocytes T mémoires (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002; Krampera, Glennie et al. 2003). Cependant, en présence d'une concentration trop faible de CSM, la prolifération des lymphocytes T peut être augmentée. En effet, Najjar et *al.* ont montré qu'en présence d'une faible concentration de CSM la prolifération de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> du sang de cordon ou du sang périphérique (dans un rapport CSM:CD3 = 1:40) était augmentée dans des co-cultures en chambres semi-perméables ou en contact direct (Najjar, Rouas et al. 2009).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'inhibition des lymphocytes T par les CSM font encore l'objet de nombreuses controverses reflétant des différences entre les conditions expérimentales (Rasmusson, Ringden et al. 2005). Cependant, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T semble dépendre à la fois d'interactions cellules-cellules et de l'intervention de facteurs solubles tels que le TGF- $\beta$  (Liu, Lu et al. 2012), la prostaglandine E2 (PGE2) (Nauta, Westerhuis et al. 2006; Najjar, Raicevic et al. 2010; Duffy, Pindjakova et al. 2011), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Krampera, Glennie et al. 2003; Meisel, Zibert et al. 2004), le NO (Lim, Kim et al. 2010), la galectine-1 et-3 (Sioud, Mobergslien et al. 2011), le LIF pour « *leukemia inhibitory factor* » (Nasef, Mazurier et al. 2008) et l'HLA-G5 (Selmani, Naji et al. 2009). Plusieurs mécanismes d'actions ont donc été proposés pour expliquer l'activité immunosuppressive des CSM sur les lymphocytes T:

- ***Rôle de la PGE2, du TGF- $\beta$  et de l'HGF***

La prostaglandine E2 (PGE2) est une molécule liposoluble synthétisée à partir d'acide arachidonique par l'action enzymatique des cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2. Les CSM expriment constitutivement la COX-2 (Tse, Pendleton et al. 2003). L'expression de la COX-2 et de la PGE2 par les CSM est augmentée en présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , suggérant que le milieu environnant influence l'activité régulatrice des CSM. Aggarwal et *al.* ont montré que la production de PGE2 par les CSM était augmentée lorsqu'elles étaient cultivées avec des lymphocytes T activés et que la neutralisation du PGE2 diminuait l'activité immunosuppressive des CSM sur les lymphocytes T sans l'inhiber complètement (Aggarwal and Pittenger 2005).

L'HGF et du TGF- $\beta$ 1 sont également exprimés constitutivement par les CSM. De plus, Ryan et *al.* ont montré qu'en présence d'IFN- $\gamma$ , leur expression était également augmentée (Ryan, Barry et al. 2007). Di Nicolas et *al.* ont montré que la neutralisation soit du TGF- $\beta$ 1 soit de l'HGF avec dans anticorps monoclonaux dans des co-cultures de lymphocytes T activés avec des CSM en chambre semi-perméable diminuait l'activité suppressive des CSM sur les lymphocytes T sans l'abroger. Cependant, la neutralisation de l'HGF et du TGF- $\beta$ 1 au même moment inhibait complètement l'activité

suppressives des CSM sur les lymphocytes T, suggérant que ces deux molécules ont un effet synergique (Di Nicola, Carlo-Stella et al. 2002).

- ***Rôle de l'IDO***

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) induite par l'IFN- $\gamma$  est une enzyme qui catalyse la conversion du tryptophane en kynurénine provoquant, d'une part, la déplétion du milieu extracellulaire en cet acide aminé essentiel à la prolifération lymphocytaire, et, d'autre part, l'accumulation de composés provenant de la dégradation de la kynurénine qui sont toxiques pour les cellules. L'induction de l'IDO représente un des mécanismes par lesquels les CSM pourraient exercer leur activité immunosuppressive (Krampera, Glennie et al. 2003; Meisel, Zibert et al. 2004). De plus, l'expression de l'IDO par les CSM aurait un effet indirect sur la prolifération des lymphocytes T via la conversion des monocytes en « *CD206<sup>+</sup> M2-like macrophages* » qui présentent une activité immunorégulatrice via la sécrétion d'IL-10 (Francois, Romieu-Mourez et al. 2012).

- ***Action de galectines***

Les galectines représentent une famille de lectines possédant une affinité particulière pour les dérivés  $\beta$ -D-galactosides. Les galectines jouent un rôle majeur dans différents processus biologiques (ex.: la croissance, la communication, la prolifération, l'apoptose,...) (Yang, Rabinovich et al. 2008). Les CSM de moelle osseuse expriment constitutivement les galectines -1, -3, -8, et -9. La galectine-1 est la molécule la mieux caractérisée de cette famille. De par son rôle dans le contrôle de la réponse immune, il a été suggéré que la galectine-1 jouerait un rôle dans l'activité immunosuppressive des CSM. Récemment, Najar et *al.* ont étudié l'expression de cette dernière par les CSM ainsi que son rôle potentiel dans leur activité immunosuppressive. Ils ont montré qu'en présence de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> activés dans des co-cultures en contact direct avec des CSM, la sécrétion de la galectine-1 par les CSM était augmentée et la prolifération des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> diminuée. L'effet de la galectine-1 dans l'activité immunosuppressive a été confirmée dans cette même étude en utilisant un anticorps bloquant la galectine-1 montrant une restauration de la prolifération des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> par rapport aux co-cultures sans anticorps neutralisant la galectine-1 (Najar, Raicevic et al. 2010).

Plus récemment, Sioud et *al.* ont montré que le blocage de la galectine-3 réduisait l'activité suppressive des CSM sur la prolifération des T mais n'inhibait pas complètement cette activité. Cependant, ils ont observé que l'inhibition de la galectine-1 et-3 abrogeait complètement l'effet suppressif des CSM sur les lymphocytes T, suggérant que la galectine-1 joue un rôle majeur dans l'activité immunosuppressive des CSM (Sioud, Mobergslien et al. 2011). De plus, Ilarregui et *al.* ont

montré que la galectine-1 participerait à la différenciation des DC en DC possédant une activité régulatrice, lesquelles induiraient la tolérance des lymphocytes T (Ilarregui, Bianco et al. 2005).

- ***Action sur les CPA***

Les CSM inhibent la maturation des DC générées à partir des monocytes en diminuant l'expression des molécules du CMH de classe II et de co-stimulation (CD1a, HLA-DR, CD40, CD80, CD86) ainsi que la sécrétion d'IL-12 (Jiang, Zhang et al. 2005). Ces DC générées en présence des CSM possèdent une capacité réduite à stimuler la prolifération des lymphocytes T dans des MLRs pour « *mixed lymphocyte reaction* ». De plus, une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, ont également été observées dans les cultures CSM/monocytes (Aggarwal and Pittenger 2005). Un des mécanismes d'action des CSM serait donc d'orienter la maturation des DC vers un phénotype régulateur afin d'atténuer la réponse des lymphocytes T (Spaggiari and Moretta 2012). Les données obtenues à partir d'expériences de culture en chambres semi-perméables indiquent que l'effet immunosuppresseur des CSM sur la différenciation des DC est liée en partie à la production de facteurs solubles (TGF- $\beta$ , IL-10 et PGE2) (Nauta, Westerhuis et al. 2006).

- ***Induction de cellules Treg***

Plusieurs études ont montré que les CSM étaient capables d'induire la génération de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg *in vitro* (Aggarwal and Pittenger 2005; Maccario, Podesta et al. 2005). En 2005, il a été démontré que les CSM exprimaient constitutivement l'HLA-G5 (Gotherstrom, West et al. 2005). HLA-G est une molécule non classique du CMH de classe I impliquée dans l'induction d'une tolérance immunologique notamment en interférant avec l'activité cytotoxique des cellules NK et des CTL, et en inhibant la prolifération des lymphocytes T et la maturation des DC (Riteau, Rouas-Freiss et al. 2001). En 2008, Selmani et al. ont montré que les CSM induisaient la génération de lymphocytes Treg via un mécanisme contact-dépendant et via la sécrétion HLA-G5 dont la sécrétion était augmentée en présence d'IL-10 (Selmani, Naji et al. 2008).

- ***Rôle de l'HO-1***

L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine, en monoxyde carbone, et en fer (Otterbein and Choi 2000). Précédemment, il a été démontré que cette enzyme induite en réponse à divers stress présente une activité anti-inflammatoire, antioxydante, et anti-apoptotique (Wagener, Volk et al. 2003; Wenzel, Oelze et al. 2007). En 2007, Chabannes et al. ont démontré que l'activité immunosuppressive des CSM humaines de moelle osseuse *in vitro* était en

partie liée à leur capacité à produire de l'HO-1 (Chabannes, Hill et al. 2007). De plus, Mougiakakos et al. ont observé *in vitro* dans des co-cultures de CSM et de PBL (« *peripheral blood lymphocytes* ») humaines (rapport 1:10) de 5 jours, que l'HO-1 sécrétée par les CSM était impliquée dans la différenciation de lymphocytes T humains activés par des alloantigènes ou des microbilles anti-CD2, CD3 et CD28 en iTreg (Mougiakakos, Jitschin et al. 2011).

- **Induction de la NOS**

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est une enzyme qui catalyse la production de NO à partir de L-arginine. Le NO est un des facteurs solubles sécrétés par les macrophages qui inhibe la prolifération des lymphocytes T en empêchant la phosphorylation de STAT-5 (Niedbala, Cai et al. 2006). En 2007, Sato et al. ont montré que l'activité immunosuppressive des CSM était en partie liée à la sécrétion de NO (Sato, Ozaki et al. 2007). Néanmoins, l'immunosuppression des lymphocytes T par le NO nécessite un contact étroit entre les lymphocytes T et les CSM en raison de l'instabilité du NO (Ren, Zhang et al. 2008).

Bien que l'activité immunorégulatrice des CSM de moelle osseuse soit la mieux caractérisée, il a été montré que les CSM dérivées d'autres tissus humains tels que la gelée de Wharton du cordon ombilical, le tissu adipeux et le cordon ombilical étaient également capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (Yoo, Jang et al. 2009). Cependant, selon l'origine des CSM, leur activité suppressive est plus ou moins influencée par la composition du milieu environnant (Raicevic, Rouas et al. 2010; Raicevic, Najjar et al. 2011).

#### **2.3.4.2. CSM et les lymphocytes B**

Corcione et al. ont montré que les CSM inhibaient à la fois la prolifération et l'activation des lymphocytes B mais également leur différenciation en plasmocytes et leur chimiotactisme. Comme observé pour les lymphocytes T (Glennie, Soeiro et al. 2005), l'interaction des lymphocytes B avec les CSM induit leur accumulation au stade G0/G1 du cycle cellulaire et non leur apoptose. L'expression des molécules de co-stimulation et la production de cytokines par les lymphocytes B ne sont pas affectées par la présence des CSM (Corcione, Benvenuto et al. 2006). Krampera et al. ont montré que, tout comme pour les lymphocytes T, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B par les CSM serait en partie liée à la sécrétion d'IDO en présence d'IFN- $\gamma$  exogène (Krampera, Cosmi et al. 2006). Dans un système *in vitro*, Rafèi et al. ont montré que l'inhibition de la synthèse d'immunoglobulines serait liée à la production de MMP (« *matrix metalloproteinases* ») par les CSM de la moelle osseuse qui clivent le CCL2 (« *chemokine ligand 2* ») en une forme antagoniste qui fixe le CCR2 (« *chemokine (C-Cmotif) receptor 2* ») exprimé à la surface des lymphocytes B, menant à une diminution de

l'expression de BLIMP-1 (« *B lymphocyte induced maturation protein 1* ») qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Cette diminution de BLIMP-1 mène donc à une inhibition de la production d'immunoglobulines (Rafei, Hsieh et al. 2008).

#### **2.3.4.3. CSM et les cellules NK**

En 2006, Spaggiari et ses collaborateurs ont montré que les CSM étaient capables d'inhiber la prolifération des cellules NK induite par l'IL-2 ou l'IL-15, leur production d'IFN- $\gamma$  ainsi que l'expression de récepteurs d'activation NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) et NKG2D (CD314) à leur surface. Les CSM n'inhibent pas l'activité lytique des cellules NK fraîchement isolées (Spaggiari, Capobianco et al. 2006). Comme pour les lymphocytes T, l'inhibition de la prolifération serait dose-dépendante mais nécessiterait à la fois des facteurs solubles et l'interaction cellules-cellules. Sotiropoulou et *al.* ont démontré que, dans les cultures à court terme avec des CSM seules, l'activité cytotoxique des cellules NK contre les cibles positives pour le CMH de classe I sont affectées (Sotiropoulou, Perez et al. 2006). Dû à une faible expression du CMH de classe I, les CSM sont hautement sensibles à la lyse par les cellules NK activées par l'IL-2. Elles n'échappent donc pas complètement à la reconnaissance par le système immunitaire. Cependant cette susceptibilité est levée en présence IFN- $\gamma$  qui augmente l'expression du CMH de classe I sur les CSM (Spaggiari, Capobianco et al. 2006). L'ILT2 (CD85) pour « *immunoglobulin-like transcript* » est un récepteur inhibiteur exprimé à la surface des cellules NK. L'ILT2 est spécifique à plusieurs molécules HLA-I mais fixe le HLA-G avec 3 à 4 fois plus d'affinité que les molécules HLA-I. HLA-G est exprimé par les CSM et peut fixer l'ILT2 sur les cellules NK, ce qui entraîne l'inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  et une inhibition de la prolifération des cellules NK (Favier, Lemaoult et al. 2010).

De par leur capacité à se différencier en différents types tissulaires ainsi qu'à réguler la réponse immune, les CSM représentent un outil thérapeutique de plus en plus envisagé notamment dans la médecine régénérative, la prise de greffe, le contrôle de maladies auto-immunes et le traitement et/ou la prévention de la GVHD ou du rejet d'organes greffés.

#### **2.3.5. CSM et immunomodulation : données *in vivo***

##### **2.3.5.1. Maladies auto-immunes**

Le **tableau 2.1** reprend différentes observations obtenues après infusion de CSM dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes dans des modèles expérimentaux animaux.

<b>Auteurs (Réfs.)</b>	<b>Contexte</b>	<b>Observations</b>
(Zappia, Casazza et al. 2005)  (Zhang, Li et al. 2005)	Modèles auto-immuns d'encéphalomyélite expérimentales (EAE).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inhibition de la prolifération des lymphocytes T.</li> <li>➤ Diminution de la démyélinisation du système nerveux central.</li> </ul>
(Deng, Han et al. 2005)	Modèle de lupus érythémateux systémique expérimental (SLE).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inhibition de la prolifération des lymphocytes T.</li> <li>➤ Inhibition de la prolifération et de la sécrétion d'IgG par les lymphocytes B.</li> <li>➤ Amélioration des signes et symptômes de la maladie.</li> </ul>
(Lee, Seo et al. 2006)	Modèle murin de diabète de type I.	➤ Augmentation du nombre d'îlots pancréatiques et de la production d'insuline.
(Zhang, Shi et al. 2009)  (Gonzalez, Gonzalez-Rey et al. 2009)	Modèles expérimentaux de colite.	➤ Amélioration des signes et symptômes en réduisant la destruction des tissus par l'inflammation.
(Xu, Wang et al. 2012)	Modèle murin de la maladie de Sjögren	➤ Diminution de l'inflammation au niveau des glandes sous-mandibulaires et augmentation significative de la fonction des glandes salivaires lorsque les CSM étaient injectées avant ou pendant le développement de la maladie.

*Tableau 2.1: Effet de l'injection de CSM dans cadre du traitement de maladies auto-immunes dans des modèles expérimentaux animaux.*

Bien que ces résultats pris dans leur ensemble soient encourageants dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes, dans certains cas l'injection de CSM ne montre aucun effet bénéfique. En effet, dans des modèles murins d'arthrite rhumatoïde il a été observé que le traitement avec des CSM était associé à une augmentation de la réponse des lymphocytes T<sub>H</sub>1. Parallèlement, dans des MLR, il a été démontré que les CSM étaient incapables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T quand elles étaient cultivées avec du TNF- $\alpha$  qui est la principale cytokine impliquée dans la cascade inflammatoire de l'arthrite rhumatoïde. De plus, une augmentation de l'IL-6 a été observée dans ces cultures, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet bénéfique des CSM dans ce modèle (Djouad, Fritz et al. 2005).

### **2.3.5.2. CSM et la prise de greffe de CSH**

Les CSM jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie de la moelle osseuse et dans la régulation de la maturation des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Leur fonction principale est de former une « niche » pour les CSH en leur fournissant des sites d'ancrage et de développement favorables grâce à un contact physique avec un stroma médullaire approprié. Il existe

de nombreuses études chez l'animal démontrant que les CSM améliorent la prise de greffe et la reconstitution hématopoïétique après greffe allogénique de CSH (Anklesaria, Sakakeeny et al. 1987; Almeida-Porada, Ascensao et al. 1996; Almeida-Porada, Brown et al. 2000), incluant plusieurs études dans des modèles de souris humanisées (Noort, Kruisselbrink et al. 2002; Bensidhoum, Chapel et al. 2004; Muguruma, Yahata et al. 2006; Hiwase, Dyson et al. 2009; Briquet, Dubois et al. 2010; Kuci, Kuci et al. 2010).

### **2.3.5.3. CSM dans le cadre de la prévention et/ou le traitement de la GVHDa**

Plusieurs études utilisant les CSM dans un but de prévention et/ou de traitement de la GVHDa ont été menées chez la souris. Cependant de nombreux résultats contradictoires persistent entre les études. Ces différences de résultats sont dues à de nombreuses variables entre les études, telles que: les méthodes d'isolation et de culture des CSM, l'origine des CSM humaines, et l'utilisation de CSM murines (dans les modèles de GVH murins) ou humaines (dans les modèles de GVH xénogéniques). En effet, les CSM murines présentent des caractéristiques distinctes des CSM humaines:

- (1) Leur activité immunosuppressive est plus faible que celles des CSM humaines (Sudres, Norol et al. 2006)
- (2) L'obtention *ex-vivo* d'une population homogène de CSM murines est plus longue (Sudres, Norol et al. 2006)
- (3) Elles ont une tendance à se transformer en cellules malignes plus rapidement *in vitro* (Miura, Miura et al. 2006);
- (4) Elles n'expriment pas l'IDO même dans des conditions de forte stimulation (Meisel, Brockers et al. 2011)

Le **tableau 2.2** reprend les différentes études menées chez la souris utilisant les CSM dans le cadre de la prévention et/ou le traitement de la GVHDa.

**-Introduction-**

Auteurs (Réf.)	Modèles souris	Source des CSM, dose et mode d'administration	Observations
(Sudres, Norol et al. 2006)	C57BL/6 → BALB/c	5×10 <sup>5</sup> , 3×10 <sup>6</sup> ou 4×10 <sup>6</sup> CSM de moelle administrées 10-15 min avant l'injection i.v. de 5×10 <sup>5</sup> cellules CD3 <sup>+</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La co-injection de CSM de moelle avec des lymphocytes CD3<sup>+</sup> dans des rapports CSM:T de 1:1, 6:1 ou 8:1 n'améliorait ni l'incidence ni la sévérité de la GVHD.</li> <li>➤ Six jours après greffe, les CSM étaient principalement retrouvées dans les poumons et la moelle et très faiblement dans les organes cibles de la GVHD.</li> </ul>
(Li, Guo et al. 2008)	C57BL/6 → BALB/c	2×10 <sup>6</sup> , 1×10 <sup>6</sup> , 2×10 <sup>5</sup> ou 2×10 <sup>4</sup> CSM de moelle injectées en i.v. au même moment que 2×10 <sup>7</sup> cellules de rate.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation de la survie des souris lors de la co-injection de 2×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>6</sup>, 2×10<sup>5</sup> CSM avec les cellules de rate.</li> <li>➤ Pas d'effet bénéfique sur l'incidence de la GVHDa lorsque 1×10<sup>6</sup> CSM/souris étaient injectées trois jours après la greffe des cellules de rate.</li> <li>➤ Diminution de la migration des lymphocytes T effecteurs dans les organes cibles de la GVHD.</li> </ul>
(Polchert, Sobinsky et al. 2008)	BALB/c → C57BL/6	1 ou 5 ×10 <sup>5</sup> CSM de moelle injectées en i.v. au J2 ou au J20 après greffe de CSH de moelle.  CSM de moelle prétraitées <i>ex-vivo</i> avec 500U/ml d'IFN-γ et co-injectées en i.v. (J0) avec les CSH.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation du temps de survie lorsque les CSM étaient injectées aux deux doses testées au J2 ou au J20 après greffe des CSH.</li> <li>➤ Pas d'amélioration du temps de survie lorsque les CSM étaient injectées au J0.</li> <li>➤ Diminution de l'incidence de la GVHD lorsque les CSM greffées au J0 étaient préalablement traitées avec de l'IFN-γ (contrairement aux CSM non traitées).</li> </ul>
(Prigozhina, Khitrin et al. 2008)	C57BL/6 → CB6F1	0.5 ou 5×10 <sup>5</sup> CSM injectées en i.v. aux J0, J7 et J14.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas d'amélioration de l'incidence de la GVHD après les injections répétées de CSM.</li> </ul>
(Yanez, Lamana et al. 2006)	C57BL/6 → B6D2F1	5×10 <sup>4</sup> CSM de tissus adipeux injectées en i.v. aux J0, J7 et J14 ou aux J14, 21 et 28.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminution de l'incidence de GVHD lors d'injections répétées (J0, J7, et J14) de CSM allogéniques.</li> <li>➤ Pas d'amélioration du temps de survie après injection d'une seule dose de CSM au moment de la greffe de CSH ou lorsque les CSM étaient greffées aux J14, 21 et 28 après greffe des CSH.</li> </ul>
(Tisato, Naresh et al. 2007)	20×10 <sup>6</sup> hPBMC → NOD/SCID	3×10 <sup>6</sup> CSM du sang de cordon ombilical injectées en i.v. aux J0, J7, J14, et J21 ou aux J14, J21, et J28.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminution du % de cellules hCD45<sup>+</sup> dans le sang périphérique des souris ayant reçu des injections répétées de CSM (J0, J7, J14 et J21) par rapport aux souris qui n'ont reçu qu'une seule injection de CSM au J0 et aux souris qui ont reçu des doses répétées retardées de CSM (J14, J21 et J28). Ces deux derniers groupes présentaient un % de cellules hCD45<sup>+</sup> comparable à celui du groupe n'ayant pas reçu de CSM.</li> </ul>
(Badillo, Peranteau et al. 2008)	C57BL/6 → B6×BALB/cF1	1.5×10 <sup>5</sup> -1×10 <sup>6</sup> CSM de moelle injectées au J0, 2, 10 ou 21 après greffe de CSH ou 0.5×10 <sup>5</sup> CSM injectées aux J0, 7 et 14 après greffe de CSH.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas de diminution de l'incidence de la GVHDa.</li> </ul>



#### 2.3.5.4. CSM et études précliniques chez le chien

Grâce à son importante diversité génétique, le chien représente un très bon modèle pour l'étude sur les greffes allogéniques. Les travaux du groupe de Storb de Seattle ont montré une prise de greffe stable après une greffe de moelle osseuse DLA (pour « *dog leukocyte antigen* »)-identique chez des chiens ayant reçu une TBI de 2 Gy et une immunosuppression après greffe constituée de MMF et de ciclosporine (Storb, Yu et al. 1999). Cependant lorsque la TBI était réduite à 1 Gy, la greffe était rejetée dans les 20 jours, en raison d'un rejet immunologique des cellules du donneur par les cellules immunitaires du chien receveur. Tout comme les CSM humaines, les CSM de la moelle osseuse des chiens peuvent être obtenues facilement après 2 ou 3 semaines de culture. De plus, elles présentent un phénotype et une activité immunosuppressive comparables aux CSM humaines.

Lee et al. ont étudié l'effet de l'injection de CSM sur la prise de greffe dans ce modèle. Quatre chiens préalablement irradiés à 1 Gy avant greffe de moelle DLA-identique et sous traitement immunosuppresseur post-greffe (ciclosporine et MMF) ont reçu des injections répétées en i.v. de CSM au J0 ( $1.2-1.8 \times 10^6$  CSM/kg) et au J35 ( $1.1-1.3 \times 10^6$  CSM/kg). Aucun des 4 chiens étudiés n'a eu une prise de greffe stable (Lee, Suzuki et al. 2011), démontrant que la co-injection de CSM ne permettait pas d'éviter le rejet du greffon dans ce modèle.

Mielcarek et al. ont étudié l'effet des injections répétées de CSM sur la prévention de la GVHD après greffe de moelle DLA haplo-identique chez 14 chiens préalablement irradiés à 9.2 Gy sans traitement immunosuppresseur. Dans ce modèle, en l'absence d'un traitement immunosuppresseur suffisant, la règle est soit un rejet du greffon (et aplasie fatale) soit GVHD létale. Dans leur étude, malgré l'injection répétée de CSM, 7 chiens sur 14 présentaient un rejet de greffe et les 7 autres sont morts de GVHD de 13 à 18 jours après greffe, démontrant que les CSM n'avaient pas d'effet immunosuppresseur significatif dans ce modèle. Cette même équipe a également étudié le « *homing* » des CSM par tomographie d'émission de positions. Ils ont montré que, directement après la greffe i.v., les CSM se retrouvaient dans les poumons. Vingt-quatre heures après la greffe, les CSM étaient préférentiellement retrouvées dans le foie et la rate et y étaient détectables jusqu'à 9 jours après greffe. Par contre, dans la moelle osseuse et l'intestin, les CSM étaient très faiblement détectables (Mielcarek, Storb et al. 2011).

Les résultats de ces deux études montrent que, bien que les CSM de chien ont un phénotype comparable aux CSM humaines, elles sont incapables d'améliorer la prise de greffe ou de prévenir la GVHD même en cas d'injections de fortes doses ou d'injections répétées.

## 2.3.6. CSM et immunomodulation: études cliniques

### 2.3.6.1. Maladies auto-immunes

Après les nombreuses données obtenues sur des modèles expérimentaux animaux de maladies auto-immunes suggérant un effet bénéfique du traitement avec des CSM, des études cliniques de phase I/II utilisant des CSM dans le cadre du traitement maladies auto-immunes ont été menées. Le **tableau 2.3** reprend les différentes observations obtenues.

Auteurs (Réf.)	Contexte	Observations
(Karussis, Karageorgiou et al. 2010)	Maladies neurodégénératives (sclérose en plaques et sclérose amyotrophique latérale).	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Stabilisation de la maladie 6 mois après greffe i.v. et/ou intrathécale de CSM autologues.</li><li>➤ Augmentation de la proportion de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg dans le sang périphérique 24h après greffe.</li></ul>
(Duijvestein, Vos et al. 2010)	Maladie intestinale inflammatoire (maladie de Crohn).	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Diminution de l'index de sévérité de la maladie de Crohn chez 3/9 pts. 6 semaines après greffe. i.v. de CSM autologues.</li><li>➤ Augmentation des FOXP3<sup>+</sup> Treg dans la muqueuse intestinale des pts. traités avec des CSM par rapport aux pts. non traités.</li><li>➤ Diminution du niveau des cytokines inflammatoires (TNF-<math>\alpha</math>, IL-1, IL-10, et IL-6) dans la muqueuse intestinale des pts. traités avec des CSM par rapport aux pts. non traités.</li></ul>
(Xu, Wang et al. 2012)	Maladie de Sjögren.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Amélioration significative des symptômes.</li></ul>

**Tableau 2.3: Observations obtenues après administration de CSM dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes dans des études cliniques de phase I/II. CSM: cellules souches mésenchymateuses; i.v.: intraveineuse; FOXP3: « forkhead box P3 »; Treg: lymphocyte T régulateur; TNF: « tumor necrosis factor »; IL: interleukine.**

Bien que les données de ces différentes études cliniques suggèrent un effet bénéfique de l'administration de CSM dans le cadre du traitement de maladies auto-immunes, des études randomisées doivent être menées afin de confirmer ces observations. De plus, des études expérimentales sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action des CSM ainsi que pour définir plus précisément la voie d'administration et la dose nécessaire afin d'obtenir un effet bénéfique à long terme en fonction de la pathologie.

### 2.3.6.2. Co-transplantation de CSM dans le cadre d'allogreffes de cellules souches

Plusieurs travaux (repris dans le **tableau 2.4**) ont été menés afin d'étudier l'impact de l'injection de CSM au moment de la greffe allogénique de CSH sur la prévention du rejet de greffe, de la GVHD, et sur l'amélioration de la prise de greffe.

Auteurs (Réf.)	N de pts.	Source des CSM, dose de CSM/kg, et mode d'administration	Observations
(Koc, Gerson et al. 2000)	28	CSM autologues de moelle ( $1-2.2 \times 10^6$ /kg [passage 2-6]) co-injectées avec des $CD34^+$ autologues de sang périphérique (moy.= $13.9 \times 10^6$ /kg).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ L'injection autologue de CSM favorise la reconstitution immunitaire après greffe de CSH autologues.</li> </ul>
(Lazarus, Koc et al. 2005)	46	CSM de moelle ( $1 \times 10^6$ [n=20]), $2.5 \times 10^6$ [n=21] ou $5 \times 10^6$ [n=5]) injectées 4h après la greffe de CSH de moelle (moy.= $2 \times 10^8$ cellules mononuclées/kg) ou de sang périphérique (moy.= $2 \times 10^6$ $CD34^+$ /kg) de donneurs HLA-identiques.	<p>Chez 46 pts. présentant des hémopathies malignes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pas de différence de prise de greffe en fonction de la dose de CSM administrée.</li> <li>➤ L'incidence de la GVHDa de grade II-III et de grade IV était de 28% et 4% respectivement.</li> <li>➤ 22% des pts. qui ont survécu au-delà du jour 90 après greffe présentaient une GVHDc extensive.</li> </ul>
(Ball, Bernardo et al. 2007)	14	CSM ( $1.0-3.3 \times 10^6$ CSM/kg) de moelle co-injectées avec des $CD34^+$ ( $21.5 \times 10^6$ /kg; range: $11.6-38.6 \times 10^6$ /kg) de moelle de donneurs HLA-incompatibles.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Amélioration de la prise de greffe chez les 14 enfants qui ont reçu les CSM par rapport aux 7/47 pts. contrôles qui n'ont reçu que des <math>CD34^+</math>.</li> </ul>
(Ning, Yang et al. 2008)	10	CSM ( $3.4 \times 10^5$ /kg; range: $0.3-15.3 \times 10^5$ /kg) de moelle co-injectées avec des CSH de moelle (moy.= $2 \times 10^8$ cellules mononuclées/kg) ou de sang périphérique (moy.= $2 \times 10^6$ $CD34^+$ /kg) de donneurs HLA-identiques.	<p>Chez 10 pts. atteints de leucémie myéloïde:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1/10 pts. développait une GVHDA de grade II-IV par rapport aux 8/15 pts. dans le groupe contrôle n'ayant pas reçu de CSM.</li> <li>➤ Les pts. qui ont reçu des CSM présentaient un risque de rechute plus grand que les pts. du groupe contrôle (60% vs. 20%) et un faible taux de survie (30% vs. 67%) dans les 3 ans après greffe.</li> </ul>
(Macmillan, Blazar et al. 2009)	8	CSM ( $2.1 \times 10^6$ CSM/kg; range: $0.9-5.0 \times 10^6$ CSM/kg) de moelle de donneurs parentaux co-injectées avec des CSH du sang de cordon ombilical ( $2.2 \times 10^5$ /kg; range: $0.6-6 \times 10^5$ $CD34^+$ /kg et $5.7 \times 10^7$ /kg; range: $1.6-13.3 \times 10^7$ TNC/kg); 3/8 pts. ont reçu une deuxième injection de CSM ( $0.06-5 \times 10^6$ CSM/kg) au jour 21 après greffe.	<p>Chez 8 enfants présentant un haut risque de rechute de leucémie aiguë:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Amélioration de la prise de greffe par rapport aux 7 pts. contrôles n'ayant pas reçu de CSM.</li> <li>➤ 3/8 pts. ont développé une GVHDA de grade II.</li> <li>➤ Aucun pt. n'a développé de GVHDc.</li> </ul>

## -Introduction-

(Meuleman, Tondreau et al. 2009)	6	CSM ( $1 \times 10^6$ CSM/kg) de moelle injectées entre le 50 <sup>ème</sup> et le 295 <sup>ème</sup> jour après greffe de CSH de sang périphérique ( $3 \text{ à } 5 \times 10^6$ CD34 <sup>+</sup> /kg).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Etude pilote qui a montré que chez 6 pts. présentant une faible reconstitution hématopoïétique après greffe myéloablatrice de CSH allogéniques, 2 pts. ont obtenu une reconstitution hématopoïétique complète après greffe de CSM provenant du même donneur.</li> </ul>
(Baron, Lechanteur et al. 2010)	20	CSM ( $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ CSM/kg) de moelle co-injectées avec des CSH du sang périphérique ( $4.8 \times 10^6$ CD34 <sup>+</sup> /kg; range: $1.6-11.8 \times 10^6$ /kg et $31.2 \times 10^7$ CD3 <sup>+</sup> /kg; range: $12-54 \times 10^7$ /kg) de donneurs non-apparentés, non HLA-identiques après un conditionnement non-myéloablateur.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1/20 pts. du groupe ayant reçu des CSM vs. 0/16 pts. du groupe contrôle ont eu un rejet de greffe.</li> <li>➤ La probabilité de décès par GVHD ou par infection à 1 ou 2 ans était de 10% dans le groupe CSM vs. 31% et 38% respectivement dans le groupe contrôle.</li> </ul>
(Bernardo, Ball et al. 2011)	13	Co-injection de CSM ( $1.9 \times 10^6$ /kg; range: $1-3.9 \times 10^6$ /kg) de moelle avec des CSH de sang de cordon ombilical ( $2.2 \times 10^5$ /kg; range: $0.6-6 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /kg et $5.7 \times 10^7$ /kg; range: $1.6-13.3 \times 10^7$ TNC/kg) HLA-incompatibles.	<p>Chez 13 enfants présentant des hémopathies malignes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Incidence du rejet de greffe était de 15% vs. 3% pour le groupe contrôle (n=39) n'ayant pas reçu de CSM.</li> <li>➤ Incidence de GVHDa de grade II-IV et de la GVHDc était de 0% vs. de 26% et 11% respectivement dans le groupe contrôle.</li> </ul>
(Lee, Lee et al. 2013)	7	Co-injection de CSM ( $1 \text{ à } 5 \times 10^6$ CSM/kg) de sang de cordon ombilical avec des CSH de sang de cordon ombilical ( $1.8 \times 10^5$ /kg; range: $1.2-2.4 \times 10^5$ CD34 <sup>+</sup> /kg et $5.1 \times 10^7$ /kg; range: $3.6-11.7 \times 10^7$ TNC/kg) HLA-incompatibles.	<p>Chez les 7 enfants atteints de leucémie aiguë:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Amélioration de la prise de greffe par comparaison au groupe contrôle (n=9).</li> <li>➤ Pas de VOD ni de TRM.</li> <li>➤ Le taux de survie après 2 ans était de 85.7% vs. 55.6% dans le groupe contrôle.</li> <li>➤ Les taux de GVHDa (II à IV) et GVHDc étaient comparables dans les 2 groupes.</li> </ul>

**Tableau 2.4: Etudes cliniques sur l'impact de l'administration de CSM sur la prévention de la GVHD après greffe de CSH allogéniques.** *VOD*: « veno-occlusive disease »; *TRM*: « transplant-related mortality »; *GVHD*: « graft-versus-host disease »; *HLA*: « human leukocyte antigen »; *CSM*: cellules souches mésenchymateuses; *CSH*: cellules souches hématopoïétiques; *TNC*: total nucleated cell; *pt(s)*: patient(s); *N*: nombre (adapté de Baron et al. (Baron and Storb 2012)).

Bien que 3 études (Ning, Yang et al. 2008; Baron, Lechanteur et al. 2010; Bernardo, Ball et al. 2011) montrent un plus faible risque de GVHDa chez les patients co-transplantés avec des CSM, suggérant un rôle bénéfique de ces dernières (et plus particulièrement chez les enfants), ces résultats doivent être pris avec précaution dû au faible nombre de patients inclus dans ces études. Des études randomisées sont nécessaires (et en cours) afin de définir plus précisément l'impact de la co-transplantation des CSM avec les CSH sur l'incidence et la sévérité de la GVHDa.

### **2.3.6.3. CSM et traitement de première ligne de la GVHDA de grade II-IV**

Les corticostéroïdes représentent le traitement de choix de la GVHDA de grade II-IV avec une réponse complète de 20% à 75%. Une étude randomisée de phase II a évalué l'effet de deux doses différentes de CSM commerciales (Prochymal<sup>®</sup> produit par Osiris Therapeutics<sup>®</sup> Inc., Baltimore, Maryland) en combinaison avec des corticostéroïdes à doses standards pour le traitement de première ligne de la GVHDA. Les CSM isolées de la moelle osseuse de 6 donneurs différents ont été amplifiées jusqu'au passage 5. Trente-deux patients avec une GVHDA de grade II (n=21), de grade III (n=8), ou de grade IV (n=3) ont reçu 2 injections de 2 ou 8 ×10<sup>6</sup> CSM/kg combinées à un traitement par corticostéroïdes. La première injection de CSM a été donnée 48h après le diagnostic de la GVHDA et la seconde a été donnée 3 jours après la première. Septante-sept pourcents de ces patients ont présenté une réponse complète et 16% une réponse partielle, et ce quelle que soit la dose de CSM injectée (Kebriaci, Isola et al. 2009).

### **2.3.6.4. CSM et traitement de la GVHDA réfractaire aux corticostéroïdes**

Les critères de diagnostic d'une GVHDA réfractaire aux corticostéroïdes sont:

- ✓ Progression de la GVHDA trois jours après le commencement de l'administration des corticostéroïdes.
- ✓ Aucune amélioration des symptômes de la GVHDA 7 jours après le commencement du traitement aux corticostéroïdes.
- ✓ Absence de réponse complète après 14 jours de prise de corticostéroïdes et/ou rechute de la GVHDA.

Le **tableau 2.5** ci-joint reprend les différentes études cliniques utilisant les CSM dans le cadre du traitement de la GVHDA réfractaire aux corticostéroïdes.

**-Introduction-**

Auteurs (Réf.)	N de pts.	Moy. d'âge des pts.	N pts. avec GVHDa de grade II/III/IV	N doses de CSM injectées/pt (N de pts.)	Dose de CSM greffées ( $\times 10^6/\text{kg}$ )	Réponse -Survie
(Le Blanc, Frassoni et al. 2008)	55	22	5/25/25	1 (27) 2 (22) 3 (4) 4 (1) 5 (1)	Médiane= 1.4 (range: 0.4-9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 39/55 pts. présentaient une RC dont:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>17 pts. avaient une RC après la 1<sup>er</sup> dose, 5 après la 2<sup>ème</sup> dose, 5 une RP après plusieurs doses et 12 pas de réponse après plusieurs injections de CSM.</li> <li>22/30 pts. avec GVHDa II à III répondaient par rapport aux 17/25 pts. ayant une GVHDa de grade IV.</li> <li>21 pts. étaient toujours en vie après 16 mois (range: 1.5-64 mois).</li> </ul> </li> </ul>
(von Bonin, Stolzel et al. 2009)	13	58	0/2/11	1 (7) 2 (4)	Médiane= 0.9 (range: 0.6-1.1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 2/13 pts. avaient une RC ou RP.</li> <li>11 pts. ont reçu un traitement immunosuppresseur supplémentaire et 28 jours plus tard, ils présentaient une réponse. Quatre patients étaient en vie &gt; 257 jours après greffe des CSM.</li> </ul>
(Lucchini, Introna et al. 2010)	11	9	4	1 (11)	Médiane= 1.2 (range: 0.7-3.7)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 4/11 pts. avaient une RC mais 2/4 pts. récidivaient une GVHDa 46 et 95 jours après greffe des CSM.</li> </ul>
(Prasad, Lucas et al. 2011)	12	6	0/7/5	Médiane 8	2 ou 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 32 jours après la première injection de CSM (Prochymal<sup>®</sup>), 1 pt. présentait une RC et 9 pts. une RP.</li> <li>➤ Le taux de survie 2 ans après la première injection de CSM était de 40%.</li> </ul>
(von Bahr, Sundberg et al. 2012)	10	52	ND	1 (5) 2 (6) 3 (1)	Médiane= 1 (range: 0.7-2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1 an après traitement par CSM, le taux de survie était de 75% pour les pts. ayant reçu des CSM de passage 1 à 2 et de 21% pour les pts. ayant reçu des CSM de passage 3 à 4.</li> <li>➤ 54% des pts. sont décédés d'infections entre le 40<sup>ème</sup> jour et 2 ans après avoir reçu des CSM.</li> <li>➤ Meilleure réponse chez les enfants que chez les adultes.</li> </ul>

**Tableau 2.5: CSM dans le traitement de la GVHDa réfractaire aux corticostéroïdes. RC: réponse complète; RP: réponse partielle; RT: réponse transitoire; pt(s): patient(s); N: nombre; moy.: moyenne; CSM: cellules souches mésenchymateuses.**

Ces différents résultats suggèrent que la greffe de CSM a un effet bénéfique sur le traitement de la GVHDa de grade II à IV réfractaire aux corticostéroïdes et plus particulièrement chez l'enfant. De plus, l'effet bénéfique des CSM est d'autant plus grand que le nombre de passages durant la culture des CSM est faible. Cependant, des études randomisées doivent être menées afin de confirmer ces résultats.

En 2010, la première étude randomisée de phase III a été réalisée en utilisant des injections répétées de  $2 \times 10^6$  CSM/kg (Prochymal<sup>®</sup>) ou de placebo pendant 4 semaines en combinaison avec un traitement de seconde ligne chez des patients atteints de la GVHDa de grade II-IV réfractaire aux corticostéroïdes. Dans les 28 premiers jours, le taux de réponse complète était de 35% dans le groupe ayant reçu des CSM (Prochymal<sup>®</sup>) et de 30% dans le groupe placebo. Au jour 28, 76% (groupe CSM) vs. 47% (groupe contrôle) présentaient une réponse complète ou réponse partielle dans le foie et 88% (groupe CSM) vs. 64% (groupe contrôle) dans le tractus gastro-intestinal. Cependant, les auteurs n'ont pas observé de différence significative entre les 2 groupes au regard du taux de réponse complète durable > 28 jours, ce qui était le premier objectif de l'étude, peut-être en raison d'un taux de réponse très élevé dans les 2 bras (avec ou sans CSM) chez les patients ayant une GVHDa cutanée (Martin, Rizzo et al. 2012).

#### **2.3.6.5. CSM et traitement de la GVHDc**

A ce jour, il y a très peu de données publiées concernant l'étude de l'impact de l'injection des CSM dans le cadre du traitement de la GVHDc. Le premier cas rapporté faisait partie de l'étude de Ringden et al. de 2004. Dans cette étude, ils ont étudié l'effet de l'injection de CSM chez un patient qui a développé une GVHDc extensive réfractaire aux corticostéroïdes 139 jours après greffe de CSH d'un donneur non-apparenté. Une dose de  $1 \times 10^6$  CSM/kg a été administrée au jour 153 après greffe. Rapidement, le patient présentait une réponse transitoire dans le foie avec une diminution des enzymes hépatiques mais aucune réponse au niveau de la peau. Deux mois plus tard, le patient a développé un syndrome lymphoprolifératif associé à une infection à l'EBV (Epstein-Barr virus) et y a succombé (Ringden, Uzunel et al. 2006).

Récemment, Zhou et al. ont apporté des données sur 4 patients atteints de GVHDc sclérodermique. Ils ont montré que les injections répétées (de 4 à 8 durant une période de 22 à 52 jours) de CSM de passage 6 directement dans la moelle osseuse à une faible dose de  $1-2 \times 10^7$  CSM/injection améliorait significativement les symptômes et la survie des patients (Zhou, Guo et al. 2010).

Weng et al. ont étudié l'effet de la greffe de CSM de moelle osseuse de donneurs HLA-identiques injectées chez 19 patients atteints de GVHDc. La médiane de la dose de CSM injectée était de  $0.6 \times 10^6$

CSM/kg (range:  $0.2-1.4 \times 10^6$  CSM/kg). Les patients ont reçu en moyenne 2 doses de CSM ( $1-5 \times 10^6$  CSM/kg) avec un intervalle de 6 mois entre les 2 injections. Sur les 19 patients, 10 présentaient une réponse partielle et 4 une réponse complète. Le taux de survie 2 ans après la première injection des CSM était de 78% (Weng, Du et al. 2010).

Ces résultats très préliminaires suggèrent que les injections répétées de CSM pourraient avoir un effet bénéfique dans le traitement de la GVHDc. Cependant, tout comme dans le cadre de la prévention et/ou du traitement de la GVHDa, ces résultats doivent être confirmés par des études randomisées.

## 3. Les lymphocytes T régulateurs

### 3.1. Historique

L'existence des lymphocytes T présentant une activité immunorégulatrice a été découverte à la fin des années 1960s à la suite de travaux menés par Nishizuka et Sakakura. Ces derniers ont montré que la thymectomie pratiquée sur des souris en période néonatale provoquait l'apparition de syndromes auto-immuns qui pouvaient être prévenus par l'injection de lymphocytes T matures (Nishizuka and Sakakura 1969). Ceci suggérait donc l'existence d'une sous-population de cellules T immunorégulatrices produites durant la période néonatale chez la souris. Cependant l'impossibilité d'identifier spécifiquement la nature de ces cellules dans les années 1980s et 1990s a conduit la communauté scientifique à s'en désintéresser progressivement.

Plus tard, les travaux menés par Sakaguchi et *al.* ont permis d'identifier le phénotype de ces cellules T suppressives représentant une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> caractérisée par l'expression constitutive de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine-2 (CD25). En effet, ils ont montré que le transfert à des souris lymphopéniques de lymphocytes T appauvris en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> conduisait en quelques semaines à l'émergence de nombreuses manifestations auto-immunes touchant la thyroïde, l'estomac, les îlots  $\beta$  du pancréas, les glandes salivaires et surrénales, les ovaires, les reins et les articulations. L'administration de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans les jours qui suivaient celle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> prévenait la survenue de ces manifestations (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Ces lymphocytes à activité immunorégulatrice furent nommés: lymphocytes T régulateurs (Treg)

En 2003, Fontenot et *al.* ont découvert que les Treg exprimaient spécifiquement un membre de la famille des facteurs de transcription FKHR («*forkhead/winged-helix family of transcription factors*»), le Foxp3 (Fontenot, Gavin et al. 2003). Les conséquences d'une absence du gène Foxp3 ont été identifiées d'abord chez les souris «*Scurfy*» (*sf*). Les souris *sf* présentent une mutation récessive liée au chromosome X du gène Foxp3 associée à une hyperprolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> caractérisée par une intense infiltration ganglionnaire, splénique, hépatique et cutanée. Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont hypersensibles à la stimulation de leur TCR et sécrètent un taux élevé de cytokines telles que l'IL-2, -4, -5, -10, -13, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, et le TNF- $\alpha$ . Ces troubles auto-immuns causent la mort précoce des souris homozygotes mâles quelques jours après la naissance (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Chez l'homme, la mutation du gène Foxp3 est également responsable d'une immunodéficiences primaire caractérisée par des dérèglements immunitaires et appelé IPEX pour

« *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome* » (Bennett, Christie et al. 2001). Sans traitement, les enfants atteints décèdent dans les premières années de leur vie des conséquences des manifestations auto-immunes.

Il a été largement démontré que le Foxp3 jouait un rôle crucial dans le développement et le fonctionnement des Treg. En effet, Fontenot et al. ont observé que les souris déficientes pour le gène Foxp3 étaient également déficientes en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mais pas en CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> et développaient une série de syndromes auto-immuns létaux (Fontenot, Gavin et al. 2003). De plus, Hori et al. ont montré que la transduction du gène Foxp3 dans des cellules T naïves (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) entraînait l'expression du CD25 et l'induction d'une fonction suppressive de ces cellules *in vitro* et *in vivo* (Hori, Nomura et al. 2003).

Le facteur de transcription Foxp3 est le marqueur qui a permis d'identifier de façon précise les Treg, et est aujourd'hui un des marqueurs les plus fiables pour leur identification, même si chez l'homme son expression peut être induite chez des lymphocytes T activés. Néanmoins, une de ses limitations majeures est que le Foxp3 est une protéine intranucléaire, et ce marqueur ne peut donc pas être utilisé pour isoler sélectivement les Treg pour des études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*. Il est donc important de trouver d'autres marqueurs de surface des Treg afin de pouvoir les isoler spécifiquement sans pour autant avoir une population de lymphocytes T effecteurs (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) contaminants. En 2006, Liu et al. ont observé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> n'exprimaient que très faiblement ou n'exprimaient pas le CD127 (chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) alors que les lymphocytes T CD25<sup>+</sup> ou CD25<sup>-</sup> l'exprimaient fortement. Le CD127 peut donc être en combinaison avec le CD25 un très bon marqueur de surface pour isoler une population pure de Treg dans le cadre de leur application pour d'éventuelles stratégies thérapeutiques (Liu, Putnam et al. 2006).

### **3.2. Origine et développement**

L'origine thymique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> fut démontrée à la suite des expériences de thymectomie néonatale menées par Nishizuka et Sakakura (Nishizuka and Sakakura 1969). Le thymus participe donc à l'induction d'une tolérance vis-à-vis du soi en générant des lymphocytes T à activité régulatrice, ce qui permet d'éliminer les lymphocytes T effecteurs auto-spécifiques.

Des études récentes ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la génération des Treg dans le thymus lors de la sélection positive. En effet, il a été mis en évidence que les Treg se développaient à partir de thymocytes présentant un TCR avec une haute affinité pour les antigènes du soi, présentés dans un contexte de CMH de classe II à la surface des cellules du stroma thymique. Cependant, il

semble que l'interaction entre TCR et antigène/CMH II ne soit pas suffisante pour induire la génération des Treg et nécessiterait l'interaction de molécules de co-stimulation (CD40 ou CD28) présentes à la surface des mTEC pour « *medullary thymic epithelial cells* » et des DC.

La présence de certaines cytokines et principalement de l'IL-2 est indispensable au développement et à l'homéostasie périphérique des Treg (Bayer, Yu et al. 2005). De plus, il a été démontré que l'administration d'IL-2 chez des patients atteints d'hémopathies malignes et ayant reçu une greffe allogénique de CSH, augmentait la fréquence de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans le sang périphérique (une moyenne de 1.9 fois plus de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) ainsi qu'une augmentation des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> exprimant le Foxp3<sup>+</sup> (une moyenne de 9.7 fois plus de CD3<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (Zorn, Nelson et al. 2006).

D'autres cytokines sont impliquées dans la régulation du compartiment régulateur. Le TGF-β, et plus particulièrement le TGF-β1, est une des cytokines jouant un rôle majeur dans l'homéostasie et l'expression du Foxp3 des Treg en périphérie. En effet, Marie et al. ont montré que les souris déficientes pour le gène TGF-β1 présentaient une diminution du nombre de Treg en périphérie mais un nombre inchangé de thymocytes Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus (Marie, Letterio et al. 2005). Plus tard, Liu et al. ont démontré que le TGF-β1 était également nécessaire au développement thymique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. En effet, ils ont observé que les souris déficientes pour le récepteur du TGF-β1 présentaient une diminution des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en période postnatale. Cette diminution était vite compensée en réponse à l'IL-2 environnante qui permettait d'atteindre un nombre normal de thymocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, suggérant que le TGF-β1 et l'IL-2 ont un effet synergique. Cela a été confirmé par la démonstration que des souris déficientes pour l'IL-2 et le TGF-β1 ont une absence complète de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans le thymus et en périphérie (Liu, Zhang et al. 2008).

Les études menées afin de mieux caractériser les Treg générés dans le thymus ont permis d'identifier d'autres sous-populations de lymphocytes T à activité régulatrice obtenues en périphérie par la conversion, après sensibilisation à un antigène, de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> naïfs en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, nommés Treg induits (iTreg). Plusieurs cytokines, notamment le TGF-β, sont impliquées dans cette conversion.

### **3.2.1. Les lymphocytes Treg induits**

Plusieurs populations d'iTreg ont été identifiées (**Figure 3.1**):

En présence de TGF-β et d'IL-2, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent acquérir une activité immunosuppressive en périphérie. Ces cellules régulatrices induites exercent leur fonction suppressive

par la production de TGF- $\beta$ . Cependant, contrairement aux nTreg, ces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induits (T<sub>H3</sub>) présentent une activité immunosuppressive transitoire et réduite *in vitro* (Hill, Feuerer et al. 2007). Cette diminution d'activité par comparaison aux CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> générés dans le thymus (nTreg) est liée à une déméthylation d'une région spécifique du gène Foxp3 qui est incomplète pour les iTreg et complète pour les nTreg (Miyara, Yoshioka et al. 2009). Néanmoins, Hippen et *al.* ont montré que la rapamycine et le TGF- $\beta$  pouvaient agir de façon synergique en induisant l'expression du Foxp3<sup>+</sup> et induire une activité suppressive stable au cours du temps *in vitro* et *in vivo* dans une population de lymphocytes T naïfs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) et mémoires (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>). La rapamycine, en plus d'inhiber mTOR, induit la signalisation TGF- $\beta$  en inhibant Smad7 qui est un antagoniste du récepteur au TGF- $\beta$ . La rapamycine inhibe également la sécrétion d'IFN- $\gamma$  (activateur de Smad 7) par les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> induite par le TGF- $\beta$ . De plus, l'induction d'une expression stable du Foxp3 dans cette population de iTreg est indépendante de la déméthylation du gène Foxp3 et passait par un autre mécanisme qui à ce jour est encore mal connu (Hippen, Merkel et al. 2011).

Sous l'effet d'une stimulation par l'IL-10, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en iTreg de type 1 (Tr1). Cette sous-population, qui n'exprime ni le CD25 ni le Foxp3, exerce une activité suppressive par la sécrétion d'IL-10.

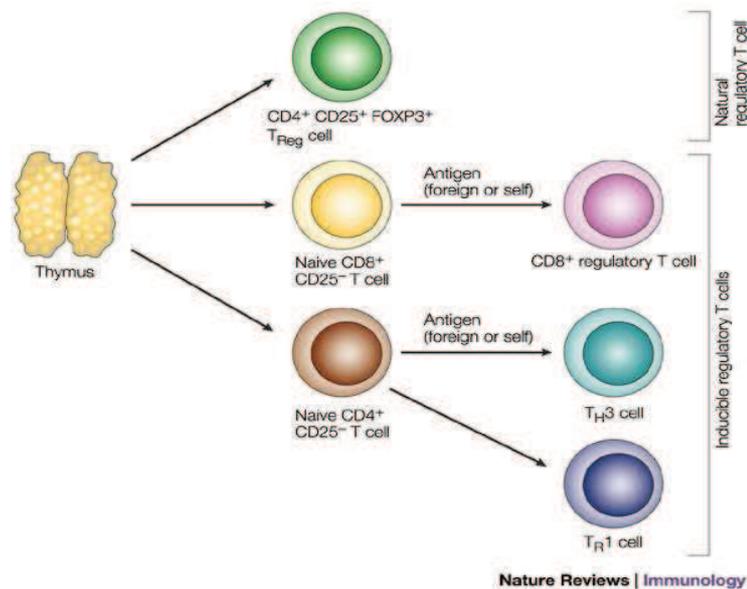


Figure 3.1: Lymphocytes T régulateurs dits naturels ou induits (détails dans le texte)(Mills 2004).

Une autre sous-population de lymphocytes T à activité régulatrice également impliquée dans le maintien d'une tolérance périphérique a également été découverte dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Niederhorn 2008). Ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dotés d'une activité régulatrice, exprimant le Foxp3, sont générés à partir de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> après stimulation antigénique. Ces CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ont la capacité d'inhiber la prolifération des CD4<sup>+</sup> naïfs et effecteurs par contact direct avec leur cible et/ou par la sécrétion de cytokines inhibitrices (IL-10 et TGF-β). Leur action immunorégulatrice est restreinte au CMH de classe I et est spécifique de l'antigène (Lu and Cantor 2008).

Plus récemment, une autre sous-population d'iTreg n'exprimant pas le Foxp3 a été identifiée. En effet, Collison et *al.* ont montré qu'en présence d'IL-35, cytokine inhibitrice hétérodimérique constituée d'EBI3 pour « *EBV-induced gene 3* » et de p35 (IL12A), membre de la famille de l'IL-12, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs activés présentaient une activité immunorégulatrice *in vivo* et *in vitro* via la sécrétion d'IL-35 (Collison, Chaturvedi et al. 2010).

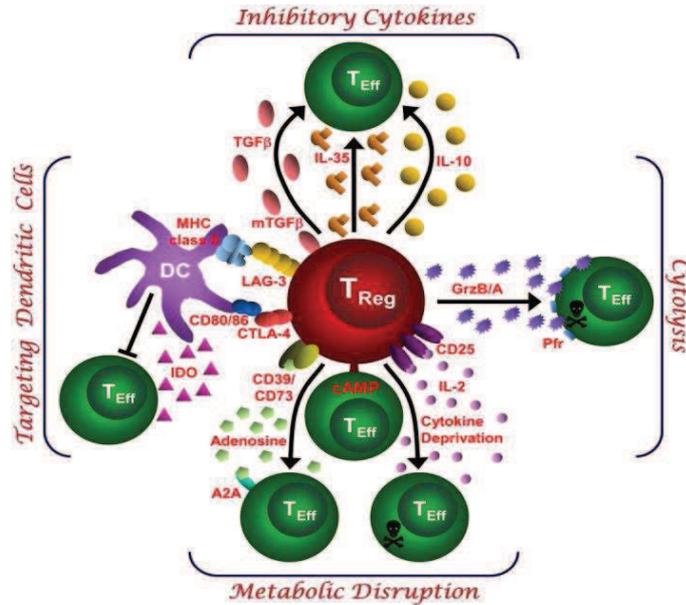
### 3.3. Mécanismes d'action immunosuppressive des Treg

Les Treg contrôlent la réponse immunitaire en contrôlant la prolifération des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en lymphocytes T effecteurs (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 et T<sub>H</sub>17). Ils peuvent également inhiber l'activité effectrice des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> différenciés et la fonction des NK, des NKT, des lymphocytes B, des macrophages, et des DC (Shevach, DiPaolo et al. 2006).

Il a été largement démontré que les Treg nécessitent l'activation de leur TCR par l'antigène dont ils sont spécifiques pour exercer leur activité immunosuppressive, qui elle, n'est pas spécifique de l'antigène. C'est ce qu'on appelle la « *bystander suppression* » (Tang et al 2008). Cette activité suppressive est notamment associée à leur capacité d'inhiber la production d'IL-2 et de promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire (anergie) (Thornton and Shevach 2000).

Bien qu'à ce jour, le mécanisme d'action des Treg ne soit pas complètement élucidé, les études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence de nombreux mécanismes par lesquels les Treg peuvent réguler la réponse immunitaire. Parmi les mécanismes identifiés, les Treg pourraient contrôler la réponse immunitaire par (**Figure 3.2**):

- (1) Sécrétion de cytokines inhibitrices
- (2) Lyse de leur cible via la production de granzyme/perforine
- (3) Dérégulation du métabolisme cellulaire
- (4) Modulation de la maturation et de la fonction des DC



**Figure 3.2: Mécanismes proposés pour expliquer le mode d'action des Treg.** Les Treg pourraient agir selon 4 voies: (1) via la sécrétion de cytokines inhibitrices; (2) par cytolyse; (3) par dérégulation du métabolisme cellulaire; (4) par modulation de la maturation et de la fonction des DC. **A2A**: récepteur à adénosine; **cAMP**: adénosine monophosphate cyclique; **IDO**: « indoleamine 2,3-dioxygénase »; **T<sub>Eff</sub>**: lymphocytes T effecteurs; **CTLA-4**: « cytotoxic T lymphocyte-associated antigen »; **Pfr**: perforine; **GrzB/A**: granzyme B/A; **TGF-β**: « transforming growth factor »; **IL**: interleukine (Collison and Vignali 2008).

### 3.4. Treg et GVHD: Etudes expérimentales

Plusieurs études utilisant des modèles murins expérimentaux de GVHDa ont démontré le rôle majeur des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg dans la prévention de la GVHDa. En 2002, Taylor et *al.* ont observé dans un modèle murin de greffe de moelle osseuse allogénique, une accélération de l'apparition de la GVHDa lorsque le greffon était appauvri *ex vivo* en CD25<sup>+</sup> ou lorsque le receveur était traité avec des anticorps anti-CD25<sup>+</sup> avant greffe. Ils ont également observé une augmentation significative de la survie des souris ayant reçu au moment de la greffe des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Taylor, Lees et al. 2002).

Plus tard, l'équipe de Negrin a quant à elle montré, dans un modèle murin de greffe allogénique non HLA-identique que l'administration de fortes doses de Treg (rapport 1:1) induisaient une diminution significative de la mortalité par GVHDa tout en préservant l'effet GVL (Edinger, Hoffmann et al. 2003). Par la suite, cette même équipe a comparé l'effet des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Treg et des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> Treg sur l'incidence d'apparition de la GVHDa. Ils ont montré que seuls les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> Treg protégeaient de la GVHDa grâce à leur capacité à migrer vers les ganglions lymphatiques et la rate et ainsi à exercer leur activité suppressive sur les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Ermann, Hoffmann et al. 2005).

D'autres études ont montré que les Treg étaient également capables de prévenir le développement de la GVHDA médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans des modèles murins de greffe allogénique avec incompatibilité pour les miHA (Jones, Murphy et al. 2003; Taylor, Panoskaltis-Mortari et al. 2004).

Par contre, très peu de travaux ont étudié l'impact de l'infusion de Treg dans des modèles murins de GVHDC. Parmi ceux-ci, Zhao et al. ont montré que les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> Treg activés *in vivo* étaient plus efficaces pour traiter la GVHDC que les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> Treg fraîchement isolés ou activés *in vitro*. Le CD103 est une intégrine hétérodimérique ( $\alpha$ E $\beta$ 7) pouvant être utilisée comme marqueur dans l'identification des Treg activés *in vivo* (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR5<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (Stephens, Andersson et al. 2007). Cette augmentation d'activité thérapeutique des CD103<sup>+</sup> Treg par comparaison aux CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> pourrait être associée au fait qu'ils expriment fortement des récepteurs aux chémokines pro-inflammatoires telle que le CCR5, ce qui leur permet de migrer dans les sites inflammatoires de la GVHDA où ils peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et B activés (Zhao 2008).

### 3.4.1. Treg et agents immunosuppresseurs

En 2005, Battaglia et al. ont montré que la rapamycine favorisait l'expansion des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg *in vitro* (Battaglia, Stabilini et al. 2005) et *in vivo*, contrairement à la CsA et au tacrolimus (Battaglia, Stabilini et al. 2006). Suite à ces résultats, différents travaux ont été menés afin d'étudier l'influence de la rapamycine ainsi que d'autres immunosuppresseurs sur l'activité suppressive et l'expansion des Treg dans différents modèles murins expérimentaux de GVHDA (**Tableau 3.1**).

Auteurs (Réf.)	Modèles de souris	Modèle de GVHD/ Dose et mode d'administration des Treg/ Immunosuppresseurs	Observations
(Zeiser, Nguyen et al. 2006)	C57Bl/6 → BALB/c	Injection i.v. de 5×10 <sup>6</sup> cellules de TCD-BM + 1.6×10 <sup>6</sup> Tconv (CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> ) au J2 après greffe de moelle + 8×10 <sup>5</sup> Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>High</sup> ) au J0, suivie de RAPA, CsA ou MMF du J0 jusqu'à la mort.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation significative du temps de survie des souris ayant reçu des Treg par rapport aux souris qui n'en ont pas reçu.</li> <li>➤ Administration de CsA diminue le temps de survie des souris par rapport aux souris des groupes Treg seul, Treg + RAPA ou Treg + MMF.</li> <li>➤ Diminution des cytokines pro-inflammatoires (IFN-<math>\gamma</math> et TNF-<math>\alpha</math>) dans les groupes Treg + RAPA, Treg seuls et Treg + MMF.</li> <li>➤ La fréquence de CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> du donneur était plus faible dans le groupe Treg + CsA que dans les groupes Treg seul, Treg + RAPA ou Treg + MMF.</li> </ul>

**-Introduction-**

(Zeiser, Leveson-Gower et al. 2008)	C57BL/6 → BALB/c	Injection i.v. de $5 \times 10^6$ cellules de TCD-BM + $1.6$ ou $1 \times 10^6$ Tconv + $CD4^+CD25^+$ Treg (rapport Treg:Tconv=1:4 ou 1:8) suivie de RAPA du J0 jusqu'à la mort.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation plus importante du temps de survie des souris ayant reçu de la RAPA et des Treg par rapport aux souris des groupes RAPA seule et Treg seuls.</li> </ul>
(Shin, Baker et al. 2011)	C57BL/6 → BALB/c	<p>Injection i.v. de <math>5 \times 10^6</math> cellules de TCD-BM + <math>1 \times 10^6</math> Tconv, suivie d'IL-2, RAPA ou RAPA + IL-2 du J0 au J7 après greffe.</p> <p>Injection i.v. de <math>5 \times 10^6</math> cellules de TCD-BM + <math>5 \times 10^5</math> Tconv <math>CD25^-</math> + <math>5 \times 10^5</math> Treg, suivie d'IL-2, RAPA ou RAPA + IL-2 du J0 au J7 après greffe.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Survie significativement augmentée dans le groupe RAPA + IL-2 par comparaison aux groupes RAPA ou IL-2 seule.</li> <li>➤ Augmentation du % de <math>CD4^+Foxp3^+</math> dans les ganglions lymphatiques des groupes RAPA et RAPA + IL-2.</li> <li>➤ Diminution du % de <math>CD4^+CD25^-</math> dans les ganglions lymphatiques des souris des 3 groupes (IL-2, RAPA, ou RAPA + IL-2) et dans la rate des souris du groupe RAPA + IL-2.</li> <li>➤ Augmentation du nombre absolu de <math>CD4^+Foxp3^+</math> dans les ganglions lymphatiques mésentériques et la rate des groupes RAPA et RAPA + IL-2.</li> <li>➤ Diminution du nombre absolu de <math>CD4^+CD25^-</math> dans les ganglions lymphatiques périphériques et la rate des groupes RAPA et RAPA + IL-2.</li> <li>➤ Diminution de l'incidence de GVHDA dans le groupe RAPA + IL-2 par rapport aux groupes IL-2 et RAPA.</li> <li>➤ Augmentation du % et du nombre absolu de <math>CD4^+Foxp3^+</math> dans le groupe RAPA + IL-2 résultant d'une augmentation de l'expansion des Treg infusés et de la conversion des <math>CD4^+CD25^-</math> en <math>CD4^+Foxp3^+</math>.</li> </ul>

**Tableau 3.1: Etude de l'impact de l'infusion de Treg sur la prévention de la GVHDA dans différents modèles murins expérimentaux en combinaison avec différents immunosuppresseurs. Tconv: lymphocytes T conventionnels  $CD4^+$  et/ou  $CD8^+$ ; TCD-BM: « T- lymphocyte-depleted bone marrow »; RAPA: rapamycine ou sirolimus; CsA: ciclosporine A; MMF: mycophénolate mofétil.**

Les résultats de ces différents travaux démontrent une diminution de l'incidence de GVHDA chez les souris ayant reçu de la rapamycine par rapport aux souris qui ont reçu du MMF ou de la CsA. Cette diminution est corrélée à une diminution de la prolifération des lymphocytes T effecteurs ainsi qu'à une augmentation du pourcentage et du nombre absolu de  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg. Ces augmentations sont dues à une expansion des cellules  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  du greffon ainsi qu'à la conversion des lymphocytes T  $CD4^+CD25^-$  en  $CD4^+CD25^+$  présentant une activité immunosuppressive.

### 3.4.2. Treg et GVHDA xénogénique

D'autres travaux ont évalué l'impact de l'infusion de Treg amplifiés ou non *ex vitro* dans des modèles murins xénogéniques de GVHDA. Les différentes observations obtenues de ces travaux sont résumées dans le **Tableau 3.2**.

Auteurs (Réf.)	Modèles de souris	Modèle de GVHD/ Dose et mode d'administration des Treg/ Méthode d'amplification <i>ex vitro</i>	Observations
(Mutis, van Rijn et al. 2006)	hPBMC → RAG <sup>-/-</sup> γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>	Injection i.v. de 13, 8, ou 4×10 <sup>6</sup> hPBMC déplétées en CD25 <sup>-</sup> ou hPBMC totales contenant 13, 8, ou 4×10 <sup>6</sup> CD25 <sup>-</sup> .  Injection i.v. de hPBMC (contenant 13×10 <sup>6</sup> CD25 <sup>-</sup> ) + 4 à 6×10 <sup>6</sup> CD25 <sup>+</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Diminution du temps de survie des souris ayant reçu des hPBMC déplétées en CD25<sup>-</sup>.</li> <li>➤ Augmentation de la prolifération des hCD3<sup>+</sup> par rapport aux souris ayant reçu des hPBMC totales.</li> <li>➤ Co-injection de hPBMC avec des CD25<sup>+</sup> autologues augmente le temps de survie des souris par rapport à celles recevant des hPBMC seules.</li> <li>➤ Diminution de la prolifération des hCD4<sup>+</sup> et hCD8<sup>+</sup> dans le groupe ayant reçu des hPBMC enrichies en CD25<sup>+</sup> plutôt que des hPBMC seules.</li> <li>➤ Augmentation du taux sérique d'IFN-γ et de l'IL-10 dans le groupe ayant reçu des hPBMC enrichies en CD25<sup>+</sup> plutôt que des hPBMC seules.</li> </ul>
(Hippen, Harker-Murray et al. 2008)	hPBMC → RAG <sup>-/-</sup> γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>	Injection i.p. de 30×10 <sup>6</sup> hPBMC + 30×10 <sup>6</sup> UCB CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Treg amplifiés <i>in vitro</i> en présence d'aAPC (KT32/4.1BBL ou KT32/OX40) ou αCD3/CD28.	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation du temps de survie des souris ayant reçu des UCB Treg amplifiés <i>ex vivo</i> par rapport aux souris ayant reçu des hPBMC.</li> <li>➤ Augmentation du temps de survie des souris ayant reçu des UCB Treg amplifiés <i>ex vivo</i> en présence d'aAPC par rapport aux souris ayant reçu des UCB Treg amplifiés <i>ex vivo</i> en présence d'αCD3/CD28.</li> <li>➤ Le % de Treg au jour 7 après greffe était 4 à 6 fois plus grand dans le sang périphérique des souris ayant reçu des UCB Treg amplifiés <i>ex vivo</i> en présence d'aAPC par rapport aux souris ayant reçu des UCB Treg amplifiés <i>ex vivo</i> en présence d'αCD3/CD28.</li> </ul>

**-Introduction-**

(Qian, Wang et al. 2011)	hPBMC → RAG2 <sup>-/-</sup> γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>	Injection i.v. de 20×10 <sup>6</sup> hPBMC CD25 <sup>-</sup> avec ou sans 5×10 <sup>6</sup> CD4 <sup>+</sup> stimulés et amplifiés <i>in vitro</i> en présence d'anti-CD3/CD28 + IL-2 (CD4 <sup>+</sup> <sub>IL-2</sub> ), IL-2 + TGF-β (CD4 <sup>+</sup> <sub>TGF-β</sub> ), ou IL-2 + TGF-β + RAPA (CD4 <sup>+</sup> <sub>RAPA/TGF-β</sub> ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation du temps de survie des souris ayant reçu des CD4<sup>+</sup><sub>RAPA/TGF-β</sub> par rapport aux souris ayant reçu des CD4<sup>+</sup><sub>TGF-β</sub>, CD4<sup>+</sup><sub>IL-2</sub> ou hPBMC seules.</li> <li>➤ Diminution de l'infiltration des hCD45<sup>+</sup> dans le foie, les poumons et les reins des souris qui ont reçu des CD4<sup>+</sup><sub>RAPA/TGF-β</sub> par rapport aux souris ayant reçu des CD4<sup>+</sup><sub>TGF-β</sub> ou CD4<sup>+</sup><sub>IL-2</sub> ou hPBMC seules.</li> <li>➤ Diminution du % de cellules hCD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> dans le sang périphérique des souris qui ont reçu des CD4<sup>+</sup><sub>RAPA/TGF-β</sub> par rapport aux souris ayant reçu des CD4<sup>+</sup><sub>TGF-β</sub> ou CD4<sup>+</sup><sub>IL-2</sub> ou hPBMC seules.</li> </ul>
(Hippen, Merkel et al. 2011)	hPBMC → NOD/SCID γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>  ou → RAG2 <sup>-/-</sup> γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>	Injection i.p. de 30×10 <sup>6</sup> hPBMC + 30×10 <sup>6</sup> de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> ou CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> obtenus <i>in vitro</i> à partir de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> ou CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> respectivement et cultivés en présence de αAPC + RAPA + TGF-β ou de αAPC (KT32) + RAPA + TGF-β (iTreg).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation du temps de survie des souris ayant reçu des iTreg allogéniques plutôt que des hPBMC seules.</li> <li>➤ Les iTreg préviennent le développement de la GVHDA de façon comparable aux nTreg.</li> <li>➤ Diminution de la prolifération des hCD4<sup>+</sup> et hCD8<sup>+</sup> après administration d'iTreg de façon comparable aux nTreg.</li> </ul>
(Vercoulen, Guichelaar et al. 2012)	hPBMC → RAG2 <sup>-/-</sup> γ <sub>c</sub> <sup>-/-</sup>	Injection i.v. de hPBMC (contenant 10×10 <sup>6</sup> CD3 <sup>+</sup> ) + 10×10 <sup>6</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (nTreg) ou CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> obtenus à partir de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> cultivés en présence d'anti-CD3/CD28 + IL-2 (iTreg).	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Augmentation significative du temps de survie des souris ayant reçu des nTreg par rapport aux souris qui ont reçu des iTreg.</li> </ul>

**Tableau 3.2: Etude de l'impact de l'infusion de Treg sur la prévention de la GVHDA dans différents modèles murins expérimentaux xénogénique en combinaison ou non avec différents immunosuppresseurs. Tconv:** lymphocytes T conventionnels CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup>; **UCB:** « umbilical cord blood »; **αAPC:** « artificial APC »; **KT32:** lignée cellulaire de cellules leucémiques érythromyéloïdes; **RAPA:** rapamycine ou sirolimus; **CsA:** ciclosporine A; **MMF:** mycophénolate mofétil; **iTreg:** Treg induits.

Ces différents résultats démontrent, tout comme dans les modèles murins non xénogéniques de GVHDA, que l'administration de Treg humains fraîchement isolés ou amplifiés *ex vitro* diminue significativement l'incidence de GVHDA dans différents modèles murins xénogéniques de GVHDA.

Cependant, en fonction des méthodes d'amplification des Treg, leur activité immunosuppressive est plus ou moins influencée. En effet, Hippen et *al.* ont montré que les Treg dérivés de sang de cordon ombilical amplifiés *ex vivo* en présence de CPA (KT32 = lignée cellulaire de cellules leucémiques érythromyéloïdes) exprimant artificiellement le signal de co-stimulation OX40L ou 4-1BB (deux

molécules de co-stimulation jouant un rôle important dans la prolifération et la survie des Treg (Zheng, Wang et al. 2004; Kroemer, Xiao et al. 2007) proliféraient en 3 semaines, 1000 fois plus que des Treg amplifiés en présence d' $\alpha$ CD3/CD28, sans perte de leur activité immunosuppressive. De plus, ils ont observé que les Treg amplifiés en présence KT32/4.1BBL ou KT32/OX40 exprimaient 2 fois moins le gène pro-apoptotique BH3 que les Treg amplifiés en présence d' $\alpha$ CD3/CD28, suggérant que cette méthode d'amplification des Treg pourrait-être adaptable en clinique (Hippen, Harker-Murray et al. 2008). Certains de ces travaux (pas tous) ont également démontré que les iTreg peuvent prévenir le développement de la GVHD. Parmi ceux-ci, Hippen *et al.* ont montré que les iTreg générés à partir de  $CD4^+CD25^-$  et  $CD4^+CD25^-CD45RA^+$  en présence de rapamycine et de TGF- $\beta$  présentaient une activité immunosuppressive comparable aux nTreg. Ils ont également observé que l'activité de ces iTreg était stable au cours du temps contrairement à celle des iTreg générés en présence de TGF- $\beta$ , suggérant un effet synergique de la rapamycine et du TGF- $\beta$  (Hippen, Merkel et al. 2011). Cependant, récemment, Vermuren *et al.* ont démontré pour la première fois que les iTreg générés à partir de  $CD4^+CD25^-$  en présence d'IL-2 et d'anti-CD3 et CD28, malgré leur activité immunosuppressive *in vitro*, étaient incapables de prévenir l'apparition de GVHDa. Cette perte d'activité était corrélée à la perte d'expression du Foxp3<sup>+</sup> par comparaison à des nTreg dont l'expression du Foxp3<sup>+</sup> et l'activité immunosuppressive était maintenue *in vivo* (Vercoulen, Guichelaar et al. 2012), suggérant qu'en fonction de la méthode d'obtention et d'amplification des iTreg, ces derniers peuvent perdre leur activité immunosuppressive *in vivo*.

### 3.4.3. Treg et GVHD: Etudes translationnelles

#### 3.4.3.1. Corrélations rétrospectives

Suite aux résultats obtenus *in vivo*, différentes études cliniques ont été menées afin d'étudier la corrélation entre le nombre de Treg présents dans le greffon et l'incidence de GVHD après greffe allogénique. De nombreuses études ont démontré que l'incidence de GVHD était inversement proportionnelle au nombre de Treg présents dans le greffon (Miura, Thoburn et al. 2004; Rezvani, Mielke et al. 2006; Rieger, Loddenkemper et al. 2006; Nadal, Garin et al. 2007). Récemment, Matsuoka *et al.* ont étudié la reconstitution immunitaire des lymphocytes T conventionnels et des Treg dans une population hétérogène de 45 patients ayant reçu une greffe allogénique de CSH et ont observé que le nombre de Treg déclinait 9 mois après la greffe et que cette diminution était corrélée à une augmentation de l'incidence de GVHDc extensive. Ces auteurs ont montré que le déclin dans le temps des Treg était dû à une lymphopénie persistante en  $CD4^+$  qui influençait sélectivement la prolifération et la survie des Treg (Matsuoka, Kim et al. 2010). Kawano *et al.* ont quant à eux analysé la longueur des télomères et l'activité de la télomérase des Treg chez 61 patients qui ont survécu 2 ans

après avoir reçu une greffe allogénique de CSH. Ils ont observé que chez les patients atteints d'une GVHDc modérée ou sans GVHDc, l'activité de la télomérase des Treg était associée à une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, une augmentation du nombre de Treg et, par conséquent, à l'établissement d'une tolérance périphérique. Par contre, les patients atteints de GVHDc sévère présentaient une augmentation de l'apoptose des Treg résultant en une diminution du nombre de Treg et à la perte de l'établissement d'une tolérance périphérique (Kawano, Kim et al. 2011).

Cependant d'autres études cliniques n'ont quant à elles pas observé de corrélation entre le nombre de Treg et l'incidence de GVHD. Par exemple, Ratajczak et al. n'ont pas observé de diminution du pourcentage de Treg chez 96 patients présentant une GVHD (aiguë et chronique) sévère au niveau du tube digestif ou de la peau par comparaison à des patients sans GVHD. Ils n'ont également pas observé d'augmentation de T<sub>H</sub>17 dans les tissus cibles de la GVHD. Cependant, ils ont observé que les patients atteints de GVHD présentaient un rapport T<sub>H</sub>17/Treg < 1 suggérant que la quantification *in situ* du rapport T<sub>H</sub>17/Treg pouvait être un marqueur spécifique dans le diagnostic de la GVHD (Ratajczak, Janin et al. 2010). Récemment, dans une étude retrospective, Rosenzweig et al. ont observé que lors de greffe allogénique de moelle osseuse sans manipulation préalable, il n'y avait pas de corrélation entre le nombre absolu ou la fréquence de Treg présents dans le greffon et l'incidence de GVHDa (Rosenzweig, Dhedin et al. 2011) contrairement à ce qui a été observé lors de greffe de cellules souches de sang périphérique (Rezvani, Mielke et al. 2006; Pabst, Schirutschke et al. 2007; Wolf, Wolf et al. 2007). Ces résultats suggèrent que le taux de Treg diffère en fonction de la source de cellules souches (de sang périphérique vs. de moelle osseuse), rejoignant ce qui avait été décrit précédemment par Blache et al. (Blache, Chauvin et al. 2010) et qui par conséquent, influence l'incidence de GVHDa.

Lord et al. n'ont observé aucune corrélation entre le pourcentage de Treg retrouvés dans des biopsies faites au niveau du tube digestif supérieur et l'incidence de GVHDa dans une cohorte de 60 patients ayant reçu une greffe allogénique de CSH, suggérant que la fréquence de Treg n'est pas un bon marqueur dans le diagnostic de la GVHDa du tube digestif supérieur (Lord, Hackman et al. 2011).

### **3.4.4. Injection de Treg**

#### **3.4.4.1. Non amplifiés**

Suite aux observations obtenues *in vivo* et dans les différentes études cliniques, une des stratégies thérapeutiques envisagées afin de prévenir le développement de la GVHD est donc d'enrichir le greffon en Treg. Récemment, Di Ianni et al. ont été les premiers à montrer que l'infusion de Treg

fraichement isolés 4 jours avant la greffe de CSH haplo-identique et de lymphocytes T conventionnels (rapport Tconv:Treg = 1:2) pouvait prévenir l'apparition de GVHDA et favoriser la reconstitution immunitaire en absence de traitement immunosuppresseur après greffe (Di Ianni, Falzetti et al. 2011).

#### **3.4.4.2. Amplification *ex vivo***

La difficulté majeure dans l'amplification des Treg *ex vivo* est de maintenir leur activité suppressive et leur capacité de migration tout en évitant l'amplification des lymphocytes T effecteurs contaminants.

Des études préliminaires ont montré que les Treg dérivés du sang de cordon ombilical était une source plus riche en Treg que le sang périphérique adulte et qu'ils pouvaient être facilement amplifiés *ex-vivo* en présence de concentrations supra-physiologiques d'IL-2 et d'une stimulation du TCR (microbilles anti- $\alpha$ CD3/CD28) sans perte ni de leur activité suppressive ni de l'expression de leurs molécules de « *homing* » (Godfrey, Spoden et al. 2005; Li, Godfrey et al. 2005).

En 2011, Brunstein et *al.* ont publié la première étude clinique de phase I utilisant des Treg dérivant du sang de cordon ombilical amplifiés et activés *ex vivo* chez des patients ayant reçu une double greffe de CSH du sang de cordon ombilical avec conditionnement non-myéloablateur dans le but de prévenir la GVHDA (Brunstein, Miller et al. 2011). Une des limitations majeures de l'utilisation du sang de cordon ombilical est en effet la quantité souvent trop faible de cellules souches pour leur utilisation thérapeutique chez l'adolescent ou l'adulte. Une double greffe de sang de cordon ombilical permet donc plus facilement d'atteindre la dose thérapeutique ( $3.0 \times 10^7$  cellules nucléées/kg) nécessaire en fonction du poids du patient (MacMillan, Weisdorf et al. 2009; Brunstein, Fuchs et al. 2011). Cependant, contrairement à la simple greffe de sang de cordon ombilical, la double greffe augmente les risques de GVHDA de grade II (MacMillan, Weisdorf et al. 2009). Dans leur étude, Brunstein et *al.* ont démontré l'efficacité de l'infusion d'une ou 2 doses à 2 semaines d'intervalle de Treg amplifiés *ex vivo* provenant du même donneur que les cellules souches de sang de cordon sur la prévention de GVHDA après double greffe sang de cordon ombilical. Ils ont également comparé l'effet de la combinaison de MMF/rapamycine avec la combinaison de MMF/CsA sur l'expansion des Treg et ont observé une augmentation (non significative) du nombre absolu des Treg dans le groupe MMF/rapamycine par comparaison au groupe MMF/CsA (Brunstein, Miller et al. 2011).

#### **3.4.4.3. Amplification *in vivo***

En 2009, Zorn et *al.* ont examiné l'impact de l'injection de faible dose d'IL-2 sur l'amplification *in vivo* de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg. Ils ont observé que l'injection d'IL-2 chez des patients qui avaient reçu une greffe allogénique de CSH avec une infusion de lymphocytes CD4<sup>+</sup> du donneur (CD4<sup>+</sup> DLI)

augmentait le pourcentage de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg dans le sang périphérique par comparaison aux patients qui n'ont reçu que de l'IL-2 ou qu'une CD4<sup>+</sup> DLI (Zorn, Mohseni et al. 2009).

Plus récemment, Koreth et *al.* ont évalué l'impact de l'injection sous-cutanée quotidienne pendant 8 semaines de faibles doses d'IL-2 sur l'amplification des Treg chez des patients présentant une GVHDc réfractaire aux glucocorticoïdes. Dans cette étude, ils n'ont observé aucun effet secondaire lié à l'injection d'IL-2. Huit semaines après le commencement des injections d'IL-2, une réponse partielle a été observée chez la moitié des patients, avec une amélioration des manifestations sclérodermiques et fibrotiques corrélée à une augmentation du nombre de Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) et du ratio Treg:Tconv (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) dans le sang périphérique (Koreth, Matsuoka et al. 2011).

Contrairement aux travaux menés sur l'impact de l'infusion de Treg dans la prévention de la GVHD, il y a très peu d'études menées sur l'effet de l'administration de Treg dans le cadre du traitement de la GVHD. Une des limitations majeures de ce type d'étude est qu'il faut un nombre important de Treg avec une pureté très élevée afin de ne pas aggraver la GVHD par infusion de Treg contaminés avec des lymphocytes T conventionnels. La dose et le moment d'administration restent également encore mal connus. De plus, l'amplification de Treg demande 2 ou 3 semaines de culture, ce qui s'avère trop long lorsque le patient présente une GVHDa avec une progression rapide et sévère.

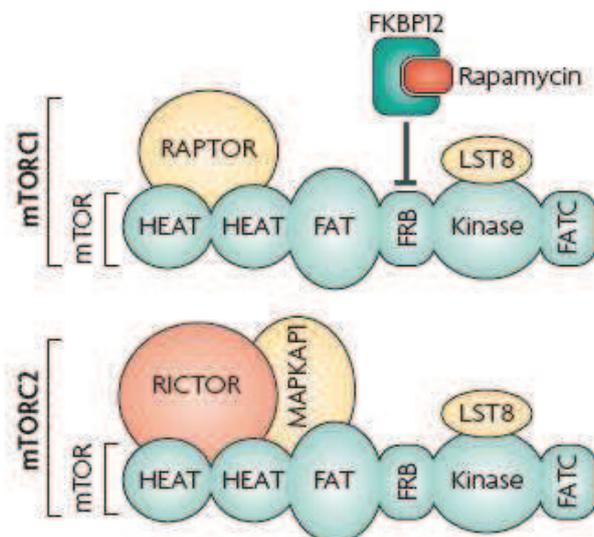
Récemment Edinger et *al.* ont mené une étude chez un faible nombre de patients présentant une GVHDa réfractaire aux corticostéroïdes. Dans cette étude, ils ont observé une amélioration des signes de GVHDa au niveau du tube digestif après la greffe de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg (95% Foxp3<sup>+</sup>) amplifiés *ex vitro* (Edinger and Hoffmann 2011). Bien que ces résultats soient encourageants, d'autres études approfondies doivent être menées afin de confirmer ces données préliminaires.

## 4. La rapamycine

La rapamycine (Sirolimus<sup>®</sup>) est un macrolide cyclique aux propriétés antifongiques et antibiotiques, initialement isolée dans les années 1970 sur l'île de Pâques (également connue sous le nom de Rapa nui) à partir du champignon *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina, Kudelski et al. 1975). Comme cité précédemment, en 1977, Martel et al. ont découvert que la rapamycine était dotée d'une activité immunosuppressive capable d'inhiber la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires (Martel, Klicius et al. 1977). Plus tard, l'étude des mécanismes d'action de la rapamycine a conduit à la découverte d'une protéine dénommée TOR pour « *Target of Rapamycin* ». Initialement découverte dans les levures, cette protéine a son homologue chez les mammifères qui est **mTOR** pour « *mammalian target of rapamycin* » (Schmelzle and Hall 2000).

### 4.1. *The mammalian Target of Rapamycin (mTOR)*

mTOR est une sérine-thréonine protéine kinase membre de la famille des PIKK (« *phosphoinositide kinase-related kinase* ») qui joue un rôle majeur dans la croissance et la prolifération cellulaire, et également dans le contrôle de l'homéostasie (Gangloff, Mueller et al. 2004). mTOR fait partie de deux complexes multiprotéiques distincts, mTORC1 et mTORC2 (**Figure 4.1**).



**Figure 4.1. Complexes multiprotéiques TORC1 et TORC2** (détails dans le texte). **mTOR**: « *mammalian Target of Rapamycin* »; **RAPTOR**: « *regulatory-associated protein of mTOR* »; **mLST8**: « *mammalian lethal with Sec 13 protein 8* »; **RICTOR**: « *rapamycin-insensitive companion of mTOR* »; **MAPKAP1**: « *mitogen-activated protein kinase-associated protein 1* »; **PIKK**: « *phosphoinositide kinase-related kinase* »; **HEAT**: « *Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR* » (Thomson, Turnquist et al. 2009).

- **mTORC1** est composé de RAPTOR pour « *regulatory-associated protein of mTOR* » et de mLST8 pour « *mammalian lethal with Sec 13 protein 8* ».
- **mTORC2** contient également mLST8 mais aussi RICTOR pour « *rapamycin-insensitive companion of mTOR* » et MAPKAP1 pour « *mitogen-activated protein kinase-associated protein 1* » (Thomson, Turnquist et al. 2009).

## 4.2. Activation et rôle de mTOR

Bien que plusieurs mécanismes moléculaires menant à l'activation de mTORC1 ont été décrits, peu d'informations concernant l'activation de mTORC2 sont actuellement disponibles, dû à l'absence d'un inhibiteur spécifique de mTORC2 (Laplante and Sabatini 2009). L'activation de mTORC1 peut être contrôlée par divers stimuli tels que (**Figure 4.2**):

- ***Des facteurs de croissance et cytokines***

Certaines cytokines telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, et l'IL-6 et des facteurs de croissance tels que l'IGF pour « *insulin-like growth factor* », l'EGF pour « *epidermal growth factor* », le PDGF pour « *platelet-derived growth factor* » activent la voie PI3K (« *phosphoinositid-3-kinase* »)-AKT menant à l'inactivation du complexe TSC pour « *tuberous sclerosis complex* » formé de TSC1 et TSC2, par phosphorylation de TSC2. TSC est un complexe inhibiteur de Rheb pour « *RAS homolog-enriched in brain* » qui est un puissant régulateur de l'activité mTORC1. Quand TSC est inactivé, Rheb se fixe à mTORC1 et l'active.

- ***Des acides aminés***

Certains acides aminés (principalement la leucine (Proud 2007) influencent l'activité de mTOR. Lorsque la leucine est présente dans l'environnement cellulaire, elle est transportée dans la cellule par un mécanisme glutamine-dépendant et, une fois dans la cellule, elle favorise la liaison de la protéine Rag (une GTPase) à RAPTOR, ce qui mène à l'interaction de TORC1 avec Rheb.

- ***Le statut énergétique***

Le statut énergétique de la cellule, déterminé par le rapport ATP/ADP intracellulaire, peut également influencer l'activité de mTOR. En effet, une diminution du rapport ATP/ADP mène à l'activation de l'AMP-kinase (« *AMP-activated protein kinase* ») qui inhibe mTORC1 en phosphorylant TSC2.

- **La disponibilité en oxygène**

L'hypoxie peut inhiber mTORC1 en favorisant l'expression de REDD 1 (« *DNA damage response 1* »). REDD 1 active mTORC1 en inactivant TSC2 (Laplante and Sabatini 2009).

L'activation de mTORC1 peut être mesurée par le taux de phosphorylation de la protéine p70S6K1 pour « *p70 ribosomal S6 kinase 1* » ou de 4EBP-1 pour « *translational inhibitor eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1* ». En fonction du stimulus responsable de l'activation de mTORC1, différentes conséquences en découlent, telles que l'inhibition de l'autophagie, l'activation du métabolisme lipidique, la synthèse protéique, ou la biogenèse mitochondriale, mais la principale conséquence de l'activation de mTORC1 est le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire.

L'activation de mTORC2 mène à l'inactivation des facteurs de transcription Foxo1 pour « *transcription factor Forkhead box O1* » et Foxo3a. Les membres de la famille des facteurs de transcription Foxo activent la transcription de gènes impliqués notamment dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. mTORC2 est également impliqué dans la réorganisation des filaments d'actine du cytosquelette par activation de PKC- $\alpha$  pour « *protein kinase C alpha* » ou de RHO pour « *small GTPase RAS homolog* ». L'activation de mTORC2 peut être mesurée par le taux de phosphorylation de AKT en Ser473 (Laplante and Sabatini 2009).

### **4.3. Inhibition de mTOR par la rapamycine**

La rapamycine inhibe mTORC1 en formant un complexe avec FKBP12 pour « *immunophilin FK506-binding protein 1A, 12 kDa* ». Le complexe rapamycine-FKBP12 se fixe sur un domaine kinase (FRB pour « *FKBP12-rapamycine-binding domain* ») de mTOR, empêchant la liaison de RAPTOR à ce dernier, et par conséquent inhibe l'activité de mTORC1 (Brown, Albers et al. 1994). Contrairement à mTORC1, mTORC2 semble être résistant à une inhibition directe par la rapamycine (Sarbasov, Ali et al. 2006). L'inhibition de mTORC1 par la rapamycine peut mener à différentes conséquences sur la différenciation, la prolifération, et la fonction de divers types cellulaires (Powell, Pollizzi et al. 2012).

#### **4.3.1. La rapamycine et les lymphocytes T**

- Inhibition de la prolifération des lymphocytes T par arrêt de leur progression dans le cycle cellulaire (Zheng, Wang et al. 2009).

- Diminution de l'expression de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T effecteurs (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, ou T<sub>H</sub>17) (Delgoffe, Kole et al. 2009).
- Différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs à mémoire lors d'une infection virale (Rao, Li et al. 2010).
- Diminution de l'expression de molécules de homing telles que le CD62L et le CCR7 qui empêche la migration des lymphocytes T effecteurs vers les tissus cibles (Sinclair, Finlay et al. 2008).
- Augmentation de la fréquence des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Contrairement aux lymphocytes T effecteurs, la rapamycine n'affecte ni la prolifération ni l'activité immunosuppressive des Treg mais au contraire favorise leur expansion relative *in vitro* (Battaglia, Stabilini et al. 2005) et *in vivo* (Battaglia, Stabilini et al. 2006). Valmori et al. ont suggéré que l'augmentation de la proportion de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en présence de rapamycine était due à l'acquisition d'un phénotype régulateur par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques (iTreg) plus que par une expansion des Treg (Valmori, Tosello et al. 2006). Actuellement, les mécanismes de cette conversion sont encore mal connus. Cette différence de sensibilité à la rapamycine entre les Treg et les lymphocytes T effecteurs suggère qu'ils n'utilisent pas la même voie de signalisation après stimulation de leur TCR. En effet, les Treg n'utilisent pas la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR mais la voie de signalisation IL-2R-STAT5 Pim2-dépendante. Pim 2 est une sérine/thréonine protéine kinase constitutivement exprimée par les Treg mais pas par les lymphocytes T effecteurs, dont l'expression est induite par le facteur de transcription Foxp3.  
En 2008, Basu et al. ont montré que la résistance des Treg à la rapamycine était intimement liée à l'expression de Pim 2 en présence d'une concentration suffisante d'IL-2 (Basu, Golovina et al. 2008).  
Plus récemment, Procaccini et al. ont montré que les Treg exprimaient la leptine et son récepteur. Ils ont observé que lors de la neutralisation de cette hormone ou la délétion du gène encodant son récepteur, l'activité de mTOR dans les Treg était diminuée, suggérant un lien étroit entre la sécrétion autocrine de leptine et l'activation de mTOR dans les Treg. Ils ont également démontré que l'activation de mTOR par la leptine maintenait l'anergie des Treg. En effet, il a été observé que la neutralisation de la leptine ou l'inhibition transitoire de mTOR induisait la prolifération des Treg en présence d'une stimulation du TCR (Procaccini, De Rosa et al. 2010).

### **4.3.2. La rapamycine et les lymphocytes B**

La prolifération des lymphocytes B passe par la voie PI3K-mTOR après stimulation de leur BCR. En inhibant mTOR, la rapamycine inhibe la prolifération des lymphocytes B, leur production de cytokines et leur différenciation en plasmocytes (Donahue and Fruman 2003; Zhang, Readinger et al. 2011; Powell, Pollizzi et al. 2012).

### **4.3.3. La rapamycine et les cellules dendritiques (DC)**

La rapamycine exerce différents effets sur la différenciation, la maturation, et la fonction des DC. Elle interfère avec la capture et la présentation de l'antigène ainsi qu'avec la production de cytokines et l'expression de chémokines (Hackstein, Taner et al. 2003; Powell, Pollizzi et al. 2012). L'effet de l'inhibition de mTOR par la rapamycine dépend largement du contexte dans lequel les DC sont activées (lors d'une infection virale ou d'une allogreffe) (Reichardt, Durr et al. 2008).

Cette capacité à inhiber la prolifération des DC et des lymphocytes T effecteurs et à favoriser l'expansion des Treg fait de la rapamycine en combinaison ou non avec d'autres immunosuppresseurs une des stratégies thérapeutiques de choix dans l'induction d'une tolérance immunologique lors d'allogreffes (Li, Li et al. 1999; Gao, Lu et al. 2007; Turnquist, Raimondi et al. 2007), dans la prévention de la GVHD (Antin, Kim et al. 2003; Cutler, Kim et al. 2004; Cutler, Li et al. 2007; Rodriguez, Nakamura et al. 2010) ainsi que dans la prévention de maladies auto-immunes (Battaglia, Stabilini et al. 2006; Lui, Tsang et al. 2008; Yong, Russo et al. 2008).

## 5. Objectifs et plan du travail

La maladie du greffon contre l'hôte est une des complications majeures après greffe allogénique de CSH. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont et ont été envisagées afin de prévenir et/ou de traiter cette maladie.

Les CSM, de par leur capacité à se différencier en différents types tissulaires d'origine mésodermique et non mésodermique ainsi qu'à réguler la réponse immune, représentent un outil thérapeutique de plus en plus envisagé dans le cadre du traitement et/ou de la prévention de certaines pathologies liées à des troubles du contrôle de la réponse immune tels que dans les maladies auto-immunes, le rejet de greffe, et la GVHD. Diverses études expérimentales menées principalement dans des modèles murins de greffe allogénique de CSH ont étudié la faisabilité de l'utilisation des CSM dans la prévention et/ou le traitement de la GVHD. Certaines de ces études ont observé que l'injection i.v. (Yanez, Lamana et al. 2006; Polchert, Sobinsky et al. 2008) ou i.p. (Christensen, Turner et al. 2010) de CSM pouvait prévenir l'apparition de GVHDa. Par contre, d'autres études également menées sur des modèles murins n'ont quand à elles pas observé d'effet bénéfique de l'infusion de CSM sur la prévention de la GVHD (Sudres, Norol et al. 2006; Badillo, Peranteau et al. 2008), il en a été de même dans une étude préclinique menée dans un modèle canin de greffe allogénique de leucocytes (Mielcarek, Storb et al. 2011). Chez l'humain, de nombreuses études de phase I-II ont montré des résultats encourageants lors de l'utilisation de CSM chez des patients présentant une GVHDa réfractaire aux corticostéroïdes (Le Blanc, Frassoni et al. 2008) et également dans le cadre de la prévention de la GVHDa (Ning, Yang et al. 2008; Baron, Lechanteur et al. 2010; Bernardo, Ball et al. 2011). Cependant, le faible nombre de patients inclus dans ces études ne permet pas de juger efficacement l'impact bénéfique de l'injection de CSM. Par contre, récemment, la première étude randomisée de phase III réalisée en utilisant des injections répétées de CSM chez des patients atteints de GVHDa de grade II-IV réfractaire aux corticostéroïdes n'ont pas observé de réponse complète durable, plus fréquente après injections répétées de CSM qu'après injection d'un placebo (Martin, Rizzo et al. 2012). Face à ces résultats expérimentaux et cliniques contradictoires, il était nécessaire de mener de nouvelles études expérimentales afin de mieux comprendre les facteurs influençant l'activité immunosuppressive des CSM de moelle osseuse.

L'objectif de la première partie de ce travail a été de développer des modèles murins xénogéniques de GVHD afin de se rapprocher au mieux des processus biologiques impliqués dans la pathophysiologie

de la GVHDA humaine et ainsi d'évaluer l'impact de l'injection de CSM sur le développement de la GVHDA selon divers modes et doses d'administration.

L'administration de la RAPA (ou sirolimus) est une des autres stratégies thérapeutiques envisagée dans le cadre de la prévention de la GVHDA. Diverses études *in vitro* ont démontré que la RAPA diminuait la prolifération et la différenciation de lymphocytes T conventionnels, favorisait leur conversion en Treg, et augmentait l'expansion des Treg dits naturels (Battaglia, Stabilini et al. 2005; Strauss, Czystowska et al. 2009). *In vivo*, dans des modèles murins de GVHDA, il a été observé que la RAPA prévenait l'apparition de la GVHDA en favorisant l'expansion de Treg. Néanmoins, il a été démontré que cette expansion était fortement influencée par la composition du milieu environnant (Shin, Baker et al. 2011). Il était donc important d'étudier l'impact de l'administration de la RAPA sur le développement de la GVHDA dans notre modèle xénogénique chez la souris NSG. Ceci était, l'objectif de la deuxième partie de ce travail.



# **Section expérimentale**

## **Partie I**

## Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease

France Bruck<sup>1,5</sup>, Ludovic Belle<sup>1,5</sup>, Chantal Lechanteur<sup>2</sup>, Laurence de Leval<sup>3</sup>, Muriel Hannon<sup>1</sup>, Sophie Dubois<sup>1</sup>, Emilie Castermans<sup>1</sup>, Stéphanie Humblet-Baron<sup>1</sup>, Souad Rahmouni<sup>1</sup>, Yves Beguin<sup>1,2,4</sup>, Alexandra Briquet<sup>1,6</sup>, and Frédéric Baron<sup>1,2,4,6</sup>

<sup>1</sup>Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)-I<sup>3</sup>, University of Liège, Liège, Belgium; <sup>2</sup> Laboratory of Cell and Genetic Therapy, University of Liège, Liège, Belgium; <sup>3</sup> Department of Pathology, University of Liège, Liège, Belgium; <sup>4</sup> Department of Medicine, Division of Hematology, University of Liège, Liège, Belgium; <sup>5</sup>the two first authors contributed equally to the work; <sup>6</sup>the two last authors are co-senior author.

Article publié dans le journal Cytotherapy: 2013 Mar;15(3):267-79.

### ABBREVIATIONS:

aASGM1: anti-asialo GM<sub>1</sub>

PerCP: peridin chlorophyll protein

APC: allophycoerythrin

Sir: sirolimus

FITC: fluorescein isothiocyanate

SRY: sex-determining region Y

Foxp3: forkhead box passage 3

TBI: total body irradiation

GVHD: graft-versus-host disease

TCR: T-cell receptor

IFN: interferon

TNF: tumor necrosis factor

IL: interleukin

IP: intraperitoneally

IV: intravenously

MSC: mesenchymal stromal cells

NOD/SCID: non-obese diabetic/severe combined immunodeficient

NSG: NOD/SCID/interleukin-2R $\gamma^{\text{null}}$

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate-buffered saline

PE: phycoerythrin

## ABSTRACT

### Background aims

Graft-versus-host disease (GVHD) is a life-threatening complication of allogeneic hematopoietic cell transplantation caused by donor T cells reacting against host tissues. Previous studies have suggested that mesenchymal stromal cells (MSC) could exert potent immunosuppressive effects.

### Methods

The ability of human bone marrow derived MSC to prevent xenogeneic GVHD in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice and in NOD/SCID/interleukin-2R $\gamma^{\text{null}}$  (NSG) mice transplanted with human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was assessed.

### Results

Injection of  $200 \times 10^6$  human PBMC intraperitoneally (IP) into sub-lethally (3.0 Gy) irradiated NOD/SCID mice also given anti-asialo GM $_1$  antibodies IP 1 day prior and 8 days after transplantation induced lethal xenogeneic GVHD in all tested mice. Co-injection of  $2 \times 10^6$  MSC IP on day 0 did not prevent lethal xenogeneic GVHD induced by injection of human PBMC. Similarly, injection of  $30 \times 10^6$  human PBMC IP into sub-lethally (2.5 Gy) irradiated NSG mice induced a lethal xenogeneic GVHD in all tested mice. Injection of  $3 \times 10^6$  MSC IP on days 0, 7, 14 and 21 did not prevent lethal xenogeneic GVHD induced by injection of human PBMC.

### Conclusions

Injection of MSC did not prevent xenogeneic GVHD in these two humanized mice models.

**Key words:** NOD/SCID mice, NSG mice; graft-versus-host disease, GVHD, mesenchymal stromal cells, MSC

## INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (GVHD), consisting of the destruction of host tissues by immune cells (mainly T cells) contained in the graft, has remained a major obstacle to allogeneic hematopoietic cell transplantation [1-4]. *In vitro* or *in vivo* T-cell depletion of the donor graft has been shown as the most powerful way for preventing acute GVHD, but it has been associated with increased risks of disease relapse [4, 5], emphasizing the need for alternative strategies.

Mesenchymal stromal cells (MSC) are multipotent progenitors within the bone marrow capable of differentiating into various cells and tissues, such as chondrocytes, osteoblasts and adipocytes [6]. Co-infusion of MSC has been shown to facilitate engraftment of human cord blood or bone marrow hematopoietic stem cells in immunodeficient mice models when low numbers of CD34<sup>+</sup> cells were injected [7]. In addition, MSC suppressed lymphocyte proliferation (without inducing specific tolerance) and inhibited naïve and memory T-cell responses to their cognate antigens *in vitro* [8-10]. The ability of MSC to inhibit T-cell alloresponses in mixed lymphoid reactions was independent of the major histocompatibility complex because inhibition was similar with “third party” haploidentical MSC or MSC that were autologous to the responder or stimulating lymphocytes [8-13]. MSC also exhibited immunosuppressive properties *in vivo*, for instance, prolonging allogeneic skin graft survival in a baboon skin graft model [14]. These observations led several groups of investigators to study the ability of MSC to prevent acute GVHD in animal models. Although some studies observed that intravenous [15-16] or intraperitoneal [17] co-infusion of MSC could prevent the development of acute GVHD in mice, MSC co-infusion failed to prevent acute GVHD in some other murine studies [18-20] as well as in a pre-clinical canine model of leukocyte antigen haploidentical transplantation [21]. Non-humanized mice studies are limited by the fact that murine and human MSC differ in several ways: (i) *in vitro* immunosuppressive abilities of mouse MSC are lower than those of human MSC, (ii) human MSC, but not mouse MSC, inhibit T cells *in vitro* at least in part by secreting indoleamine 2,3-dioxygenase and (iii) mouse MSC are more prone to undergo immortalization and transformation in culture than human MSC [18, 22, 23].

In humans, numerous phase I–II prospective studies suggested that MSC infusion might promote engraftment in patients given grafts from human leukocyte antigen haploidentical donors [24], cure selected patients with steroid-refractory acute GVHD [25] and prevent GVHD when co-infused with hematopoietic stem cells [26-28]. However, MSC infusion failed to increase (statistically significantly) the rate of sustained complete response in patients with steroid-refractory acute GVHD in a phase III randomized study [29]. These discrepancies among studies stressed the need for developing animal models to study the efficacy of human MSC as prevention or treatment of GVHD.

Given that MSC are thought to act mainly by secreting soluble factors [30] and given that MSC culture and expansion conditions influence their secretion profiles [30], models that could compare the efficacy of different human MSC preparations to prevent GVHD are urgently needed.

## **METHODS**

The study was approved by the human and animal ethics committees of the University of Liege. Written informed consent was obtained from all bone marrow and buffy coat donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **Isolation and expansion culture of human MSC**

Bone marrow cells were obtained by bone marrow aspirates drawn from the iliac crest of adult volunteers. For most experiments, mononuclear bone marrow cells were isolated by Ficoll-Paque PLUS density gradient (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium), re-suspended in human MSC medium consisting of mesenchymal stem cell growth medium (Lonza) and plated at  $9 \times 10^7$  cells/T175 flask (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA). After 24 h of culture, non-adherent cells were removed. When 70–80% confluence was achieved, adherent cells were detached and re-plated at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup>. The same conditions were used for subsequent passages.

For some experiments, MSC were generated as previously described [28] for clinical use. Briefly, mononuclear bone marrow cells were isolated by Ficoll-Paque density gradient, seeded in sterile tissue culture flasks (BD Falcon; BD Biosciences, Bedford, MA, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, low glucose (Invitrogen, Merelbeke, Belgium), with glutamate supplemented with 10% irradiated fetal bovine serum (HyClone-Perbio Science, Merelbeke, Belgium) and antibiotics (penicillin/streptomycin; Lonza). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide for about 4 weeks. The medium was replaced twice every week. Cells were near confluence (> 70%) after 2 weeks of culture under these conditions. Cells were detached using irradiated trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Invitrogen) and plated (passaged) at a lower density to allow further expansion. At the second passage, cells were either injected into mice or cultured for an additional one to two passages in mesenchymal stem cell growth medium as described. In an additional experiment, MSC were activated with 100 IU/mL interferon (IFN)- $\gamma$ , 24 h before injection to NSG mice.

### Phenotypic characterization of MSC

After the third passage, cultured cells were immunophenotyped using the following antibodies: allophycoerythrin (APC)-conjugated anti-CD45 (H130 clone), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD90 (5E10 clone), PE-conjugated anti-CD11b (D12 clone), PE-conjugated anti-CD34 (581/CD34 clone), PE-conjugated anti-CD73 (AD2 clone), PE-conjugated anti-CD106 (51-10C9 clone), PE-conjugated anti-CD14 (MφP9 clone) (all from Becton Dickinson) and PE-conjugated anti-CD105 (SN6 clone) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Cells were incubated with antibodies or isotype-matched control IgG (all from Becton Dickinson) for 30 min at 4°C in the dark. Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA). MSC in the current study were uniformly negative for hematopoietic markers including CD11b, CD14, CD34 and CD45 antigens and positive for CD73, CD90, CD105 and CD106 antigens (data not shown).

To assess the capacity of MSC to differentiate into fat, bone and cartilage, we cultivated them under specific induction conditions as previously described [31]. In all tested cultures, lipid vacuoles, calcium deposits and chondrogenic differentiation were evidenced by staining with oil red O, alizarin red, and toluidine blue, demonstrating the differentiation ability of cultured MSC (data not shown).

### MSC immunosuppression assays

In flat-bottom 96-well plates (Becton Dickinson),  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  or  $5 \times 10^4$  MSCs were plated in triplicates in a total volume of 100  $\mu$ L of RPMI medium 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, L-glutamine (2 mmol/L) (all from Lonza), N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (25 mmol/L), sodium pyruvate (100 mol/L), non-essential amino acid (100 mol/L) and  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol (all from Gibco, Merelbeke, Belgium). After 5-h incubation, MSC were irradiated at 25 Gy using a  $^{137}\text{Cs}$  source (GammaCell 40; Nordion, Ontario, Canada). Allogeneic human peripheral mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coat by Ficoll-Paque PLUS density gradient. PBMC ( $5 \times 10^4$ ) were added to wells in a total volume of 200  $\mu$ L containing irradiated MSC or not containing irradiated MSC, in the presence of anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads (Invitrogen Dynal A/S, Oslo, Norway). Co-cultures without anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads were used as controls. Cells were incubated at 37°C in 5% humidified air for 4 days. Cell cycle analyses of PBMCs stimulated with anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads or not stimulated with anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads and cultivated during 4 days with or without MSCs were performed using CycleTEST Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson) as previously reported [32]. The percentage of cells in the different phases of the cell cycle was determined with ModFit software (Becton Dickinson). In the current study, MSC inhibited PBMC proliferation. In the absence of MSCs,

the percentages of cells in G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle were 50 ± 5%. When MSC were present, this percentage decreased to 43 ± 10 (*P* = 0.07) at a PBMC/MSC ratio of 10:1 to reach 35 ± 10 (*P* = 0.02) at a ratio of 10:5 and finally 26 ± 3% (*P* < 0.0001) at a ratio of 1:1 (**Supplementary Figure 1**).

Proliferation was also assessed using <sup>3</sup>[H]-thymidine (PerkinElmer, Boston, MA, USA) incorporation. During 4 days, 1 × 10<sup>5</sup> or 1 × 10<sup>6</sup> PBMC stimulated with anti-αCD3/CD28 microbeads or phytohemagglutinin (10 μg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) with or without irradiated (25 Gy) 1 × 10<sup>5</sup> MSC were cultivated. To each well, 6.7 Ci/mmol (248 GBq/mmol) of <sup>3</sup>[H]-thymidine was added in 25 μL 16 h before the end of the co-culture. The cells were harvested automatically on a glass filter, using a Tomtec harvesting machine (Hamden, CT, USA) on day 4. Thymidine incorporation was expressed as counts per minute. In the presence of irradiated MSC, we observed that PBMC proliferation was significantly reduced at both MSC/PBMC ratios (*P* < 0.0001) (**Supplementary Figure 1C**).

## **Development of humanized murine models of GVHD**

### **NOD/SCID mice**

To induce GVHD, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice received on day -1 a single dose of 3.0 Gy total body irradiation (TBI) using <sup>137</sup>Cs source and injected IP with 20 μL of anti-asialo GM<sub>1</sub> (aASGM1) antibody (Wako Chemicals USA, Dallas, TX, USA). PBMC were isolated from buffy coats by centrifugation over Ficoll-Paque PLUS density gradient and washed twice in PBS. Cells were counted with an HORIBA ABX automatic cell counter (ABX Hematology, Montpellier, France) and re-suspended in PBS at a concentration of 200 × 10<sup>6</sup>/400 μL. Cell suspensions were injected IP into mice under sterile conditions on day 0. Transplanted mice received a second dose of 20 μL of aASGM1 antibody administered IP 8 days later.

### **NSG mice**

NOD/SCID/interleukin-2Rγ<sup>null</sup> (NSG) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were irradiated with 2.5 Gy TBI using a <sup>137</sup>Cs source 1 day before intraperitoneal injection of human PBMC obtained from buffy coats from healthy volunteers. PBMC were isolated as described previously. Cells were counted with a HORIBA ABX automatic cell counter and re-suspended in PBS. Four doses of human PBMC (10 × 10<sup>6</sup>, 20 × 10<sup>6</sup>, 30 × 10<sup>6</sup> or 50 × 10<sup>6</sup>) were infused to test their ability to induce xenogeneic GVHD. Mice were tagged on day 0, weighed twice weekly, and assessed for symptoms of xenogeneic GVHD including weight loss, posture (hunching), reduced activity, ruffled fur texture, anemia and tachypnea. Mice with terminal GVHD were sacrificed and examined for human cell infiltration by flow cytometry, histologic analysis and immunochemistry.

### **Capacity of MSC to prevent or to treat GVHD in NOD/SCID and NSG mice models**

To assess the ability of MSC to prevent GVHD in our models, NOD/SCID or NSG mice received  $2 \times 10^6$  MSC or  $3 \times 10^6$  MSC from passages three or four IP at the time of PBMC injection. For the NSG model, mice received three additional injections of MSC (total number of cells,  $12 \times 10^6$  MSC) at weekly intervals. In a second set of experiments, NSG mice received  $3 \times 10^6$  MSC at passages three or four intravenously at the time of PBMC injection and at weekly intervals for three administrations (total dose,  $9 \times 10^6$  MSC). Finally, in an additional experiment, some NSG mice were given intraperitoneal sirolimus (Rapamune at 1.5 mg/kg from day 0 to day 7 and 1 mg/kg from day 8 to day 21; Pfizer, New York, NY, USA).

### **Flow cytometry analyses for detection of human engraftment**

At the time of necropsy, peripheral blood, spleen and bone marrow were harvested and analyzed by flow cytometry. Splenocytes were obtained by crushing the spleen, and bone marrow was obtained by flushing the femurs and tibiae. Cells were counted in a HORIBA ABX. To demonstrate human engraftment, a first gate on living cells was made using the SSC/FSC dot plot, and the percentage of human CD45<sup>+</sup> cells (identified using the anti-human CD45 APC or PE-Cy7 (clone, HI30; eBioscience, San Diego, CA, USA) among total living cells was calculated [31]. The following antibodies specific for human cell surface antigens were used: APC or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 (SK3 clone; Becton Dickinson), peridin chlorophyll protein-conjugated (PerCP) (SK3 clone; Becton Dickinson) or efluor 450 (RPA-T4 clone; eBioscience) anti-CD4, PE-conjugated anti-CD8 (HIT8a clone; Becton Dickinson), PE-conjugated anti-CD25 (BC96 clone; eBioscience). Cells ( $1.5 \times 10^6$ - $2 \times 10^6$  cells/sample) were incubated with antibodies or isotype-matched control IgG (all MOPC 21 clone; Becton Dickinson) for 30 min at 4°C in the dark. The resulting cell pellet was depleted of erythrocytes using a ammonium chloride solution (pH 7.2). Cells were washed twice with PBS/1% fetal bovine serum (Lonza) and fixed in PBS/1% formalin (Sigma Aldrich). Human intracellular transcription factor forkhead box passage 3 (Foxp3) staining kit containing AlexaFluor 488 anti-Foxp3 (206D clone), isotype-matched control IgG, Fix/Perm solution, and Fix/Perm buffer was purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Foxp3 intracellular staining was achieved as described by the manufacturer's instructions. Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo software 7.0 (Tree Star Inc).

### **Histology and immunochemistry**

Small intestine, liver, lungs and skin were harvested, washed with PBS, fixed in 10% formalin (Sigma Aldrich) and routinely processed for paraffin embedding. For all organs, 5- $\mu$ m sections were stained with hematoxylin and eosin for histologic examination. Immunostaining was performed on 5- $\mu$ m

sections manually for CD45 (2B11+PD7/26 clone; DakoCytomation) using a standard indirect two-step labeling method or on a BenchMark XT autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) for CD3 (clone PS1; Novocastra/Leica, Newcastle Upon Tyne, UK), CD4 (clone 1F6; Novocastra/Leica) and CD8 (clone C8/144B; DakoCytomation). Staining with sirius red was performed to evaluate fibrosis in the liver, skin and lungs of a NSG mouse who developed signs of chronic GVHD after intraperitoneal infusion of PBMC and MSC.

#### **Detection and quantification of MSC engraftment in NOD/SCID mice**

NOD/SCID mice irradiated with 3.0 Gy TBI on day-1 received  $2 \times 10^6$  MSC IP on day 0. aASGM1 antibodies (20  $\mu$ L) were injected IP on day -1 and day 8 after MSC infusion. Mice were sacrificed on day 1, 7 or 14. Lungs, liver, kidneys, small intestine, spleen and bone marrow were collected and frozen. Homing of MSC was studied by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) (using Power SYBRGreen PCR master mix; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; and ABI PRISM 7700; Altera, Norwalk, CT, USA) as previously reported [31] ([Supplementary text](#)).

#### **Detection and quantification of engraftment or homing of MSC in NSG mice with xenogeneic GVHD**

NSG mice were irradiated with 2.5 Gy TBI on day-1 then received  $3 \times 10^6$  MSC from male donors at the time of injection of  $30 \times 10^6$  PBMC from female donors and at weekly intervals for four administrations (total dose,  $12 \times 10^6$  MSC). Mice with terminal GVHD were euthanized, and peripheral blood, lungs, liver, small intestine, colon, spleen, bone marrow, peritoneum and peritoneal fluid were collected and frozen. Genomic DNA was extracted as described previously. MSC homing was analyzed by sex-determining region Y (SRY) TaqMan real-time PCR after genomic DNA amplification by PCR (nested PCR) as previously reported by Lo *et al.* [33].

#### **CDR3 spectratyping (immunoscope)**

To characterize better T-cell expansion in our models of xenogeneic GVHD, T-cell receptor (TCR)  $\beta$  chain CDR3 spectratyping analyses were performed on PBMC before injection into mice and on cells collected on day 13 from spleens of four NOD/SCID mice given  $200 \times 10^6$  human PBMC IP after 3.0 Gy irradiation (cells from the different mice were pooled before RNA extraction) or from spleens of five NSG mice given  $30 \times 10^6$  human PBMC IP after 2.5 Gy irradiation (cells from the different mice were pooled before RNA extraction) as previously reported [34-35]. The overall complexity within a TCR  $V_\beta$  subfamily was determined by counting the number of peaks (intervals of three nucleotides) per subfamily.

### **Serum cytokine levels (immunoscope)**

The concentration of human IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were determined in mice serum using Bio-Plex Pro Human Cytokine 9-plex Assay (Biorad Laboratories, Nazareth Eke, Belgium). The experiments were performed according to the manufacturer's recommendation, and results were acquired on Bio-Plex System and analyzed with Bio-Plex Manager Software 4.0 (Biorad Laboratories).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5.00 Software (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used to assess the impact of MSC on cell proliferation *in vitro*, the cytokine levels in NSG mice on day 8 after transplantation and the percentages of human cells at necropsy between MSC and control mice. Survival curves were modeled using the Kaplan-Meier methods. Comparisons between groups were made with the log-rank test. All *P* values were two sided. *P* values < 0.05 were considered as statistically significant.

## **RESULTS**

### **MSC injected IP into NOD/SCID mice migrate to other organs**

The homing capacity of MSC to several tissues was tested at three different times. MSC were detected in the liver, kidney and spleen of one of three tested mice and in the small bowel of another mouse 24 hours after intraperitoneal infusion of MSC (**Supplementary Table I**). MSC were detected in the bone marrows of all tested mice and in the spleen, kidneys, small bowel, liver and lungs in two of four, two of four, two of four, one of four and one of four mice 7 days after MSC infusion. Finally, MSC were observed in the bone marrow of three of four mice and in the spleen or kidneys or both of three of four mice 14 days after MSC infusion. These results suggest that MSC injected IP could migrate to different organs but perhaps homed preferentially to the bone marrow.

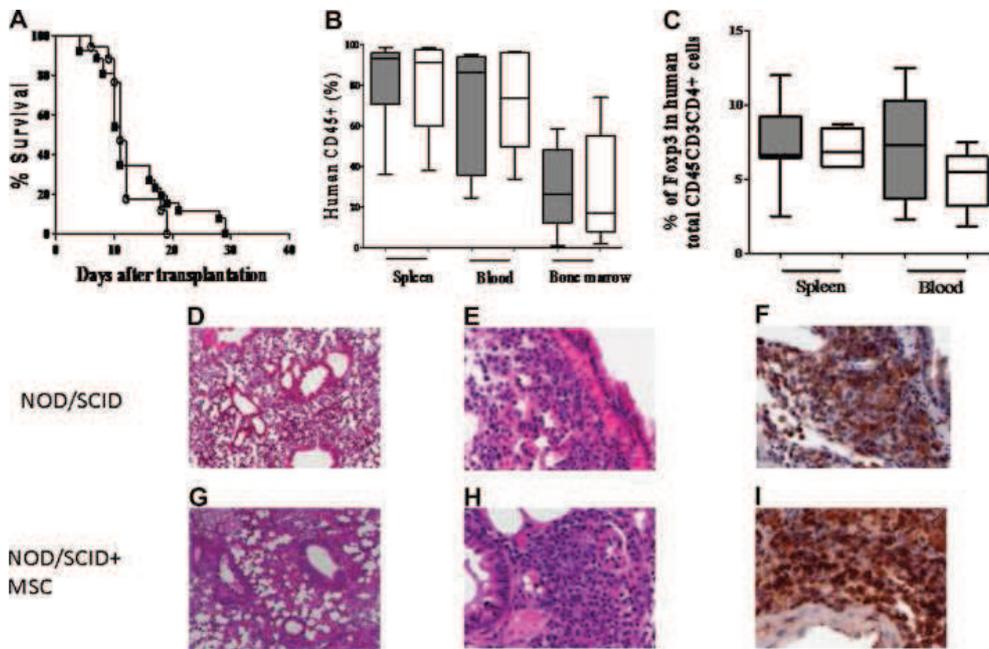
### **Establishment of a model of xenogeneic GVHD into NOD/SCID mice**

In two independent experiments of three NOD/SCID mice each, mice were irradiated at 3.0 Gy and administered aASGM1 antibody IP 1 day before and 8 days after being IP transplanted with  $2 \times 10^8$  human PBMC. In the first experiment, mice died on days 10, 13 and 14; in the second experiment, two mice died on day 8 and one mouse died on day 7 after transplantation. At the time of necropsy, human chimerism levels (human CD45<sup>+</sup> cells) in the five mice surviving  $\geq 8$  days were 61% (range, 21–92%) in the spleen (n = 5) and 6% (range, 1–24%) in the bone marrow (n = 5).

In a third experiment, we compared TCR V $\beta$  repertoire in PBMC before injection into NOD/SCID mice and in spleen cells collected from NOD/SCID mice 13 days after intraperitoneal PBMC infusion. The number of peaks in each family was comparable among PBMC before injection (median of 10 peaks/V $\beta$  family) and among spleen cells 13 days after infusion (median of 11 peaks/V $\beta$  family), demonstrating a homogeneous T-cell expansion.

**IP infusion of MSC does not prevent xenogeneic GVHD in the NOD/SCID mice**

In a first set of experiments, we assessed the ability of human MSC ( $2 \times 10^6$  cells) IP co-transplanted with human PBMC ( $2 \times 10^8$  cells) to prevent lethal GVHD in NOD/SCID mice given 3.0 Gy TBI on day-1 and aASGM1 antibody on days-1 and 8 after transplantation. All mice given MSC/PBMC (n = 17) and all control-PBMC mice (given PBMC alone, n = 26) showed signs of GVHD, such as anemia, loss of locomotion and weight loss died within the first 30 days after transplantation (**Figure 1A**).



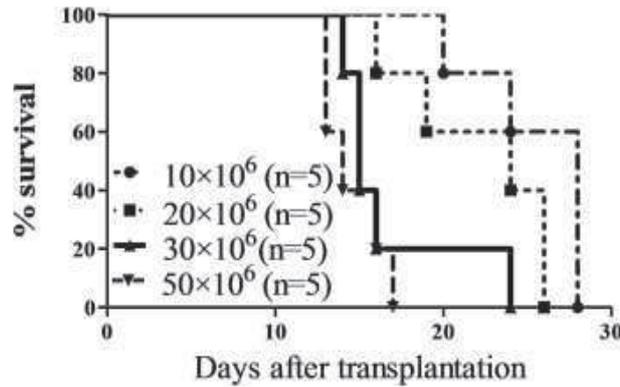
**Figure 1. Impact of a single IP infusion of MSC on xenogeneic GVHD in NOD/SCID mice.** NOD/SCID mice irradiated with 3.0 Gy on day-1 received  $2 \times 10^8$  PBMC i.p. on day 0 with or without  $2 \times 10^6$  MSC also infused IP (A) Overall survival in mice given (open circles, n = 17) or not (black squares, n = 26) MSC. (B) Percentage of human CD45<sup>+</sup> in spleen (n = 19 in PBMC arm vs. n = 11 in MSC arm), blood (n = 14 in PBMC arm vs. n = 8 in MSC arm) or bone marrow (n = 16 in PBMC arm vs. n = 11 in MSC arm) of mice given (grey bars) or not (white bars) MSC. (C) Percentage of human Foxp3<sup>+</sup> cells among total human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in spleen (n = 7 in PBMC arm vs. n=4 in MSC arm) and blood (n = 5 in PBMC arm vs. n= 5 in MSC arm) of mice given (grey bars) or not (white bars) MSC. Horizontal lines represent median values in each group. (D-I) Microscopic features of the lungs at the time of necropsy in control (D-F) versus MSC mice (G-I); at low magnification (D and G, hematoxylin and eosin,  $\times 50$ ) lymphoid infiltrates with a perivascular and peribronchial distribution were observed in both groups; at high magnification (E and H, hematoxylin and eosin,  $\times 400$ ), the infiltrates were cytologically pleomorphic with a high proportion of large cells displaying mitotic activity; immunostainings with anti-human-CD3 showed a high proportion of CD3<sup>+</sup> cells of donor origin (immunoperoxidase,  $\times 400$ ).

At the time of necropsy, both groups of mice had similar infiltration by human cells in the blood (median of human CD45<sup>+</sup> cells was 74% [range, 34–96%] in MSC/PBMC mice versus 86% [range, 24–95%] in PBMC mice), in the spleen (91% [range, 38–98%] in MSC/PBMC mice versus 93% [range, 36–98%] in PBMC mice) and in the bone marrow (17% [range, 2–74%] in MSC/PBMC mice versus 26% [range, 1–59%] in PBMC mice) (**Figure 1B**). The frequency of Foxp3<sup>+</sup> cells among total human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells was similar in MSC/PBMC mice compared with PBMC mice (7% [range, 6–9%] versus 7% [range, 3–12%] in the spleen and 6% [range, 2–8%] versus 7% [range, 2–12%] in the blood (**Figure 1C**).

In a second set of experiments, we investigated whether intravenous (IV) infusion of MSC ( $2 \times 10^6$  cells) on day 0 could prevent xenogeneic GVHD in NOD/SCID mice given 3.0 Gy TBI on day-1, human PBMC ( $2 \times 10^8$  cells) IP on day 0, and aASGM1 antibodies on days-1 and 8 after transplantation. As observed with intraperitoneal injection of MSC, intravenous infusion of MSC failed to prevent GVHD, with MSC/PBMC mice (n = 4) dying on days 4, 6, 12 and 12 after transplantation and control mice (n = 6) dying on days 6, 9, 10, 10, 10 and 11 after transplantation. Mice in the two groups showed similar infiltration by human cells in the blood, bone marrow and spleen (data not shown).

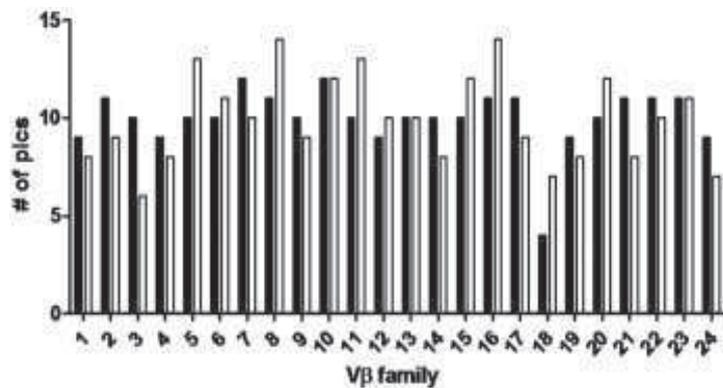
### **NSG mice model of xenogeneic GVHD**

Given that MSC infusion administered at a MSC/PBMC ratio of 1:100 failed to prevent xenogeneic GVHD in NOD/SCID mice, we developed a second model of xenogeneic GVHD in NSG mice that were previously shown to be the immunodeficient mouse strain allowing the highest engraftment of human cells [36], with the aim of administering MSC at a higher MSC/PBMC ratio. We first determined the minimum number of human PBMC to transplant in 2.5 Gy irradiated NSG mice that could induce reproducible lethal GVHD within the first 25 days after transplantation with a high percentage ( $\geq 10\%$ ) of human infiltration in the bone marrow. To do so, 20 NSG mice received 2.5 Gy TBI on day-1 followed by intraperitoneal infusion of human PBMC on day 0 at  $10 \times 10^6$  (n = 5),  $20 \times 10^6$  (n = 5),  $30 \times 10^6$  (n = 5) or  $50 \times 10^6$  (n = 5) PBMC per mouse. As shown in **Figure 2**, mice injected IP with  $30 \times 10^6$  human PBMC died 14–24 days after transplantation with signs of GVHD and a high percentage of human lymphocyte infiltration in the bone marrow (**Table I**). We chose these conditions to test the ability of MSC co-transplantation to prevent xenogeneic GVHD in this model.



**Figure 2.** Survival of NSG mice according to the number of human PBMC infused IP. NSG mice were irradiated with 2.5 Gy TBI one day before IP injection of  $10 \times 10^6$  ( $n = 5$ ),  $20 \times 10^6$  ( $n = 5$ ),  $30 \times 10^6$  ( $n = 5$ ) or  $50 \times 10^6$  ( $n = 5$ ) PBMC. Median survival time in each group was 28, 24, 15, and 14 days, respectively ( $P < 0.01$ ).

In a second experiment, we compared TCR  $V_{\beta}$  repertoire in PBMC before injection into NSG mice and in spleen cells collected from NSG mice ( $n = 5$ ) 13 days after intraperitoneal infusion of PBMC. The number of peaks in each family was comparable among PBMC before injection (median of 10 peaks/ $V_{\beta}$  family) and among spleen cells 13 days after infusion (median of 10 peaks/ $V_{\beta}$  family), demonstrating homogeneous T-cell expansion (**Figure 3**).

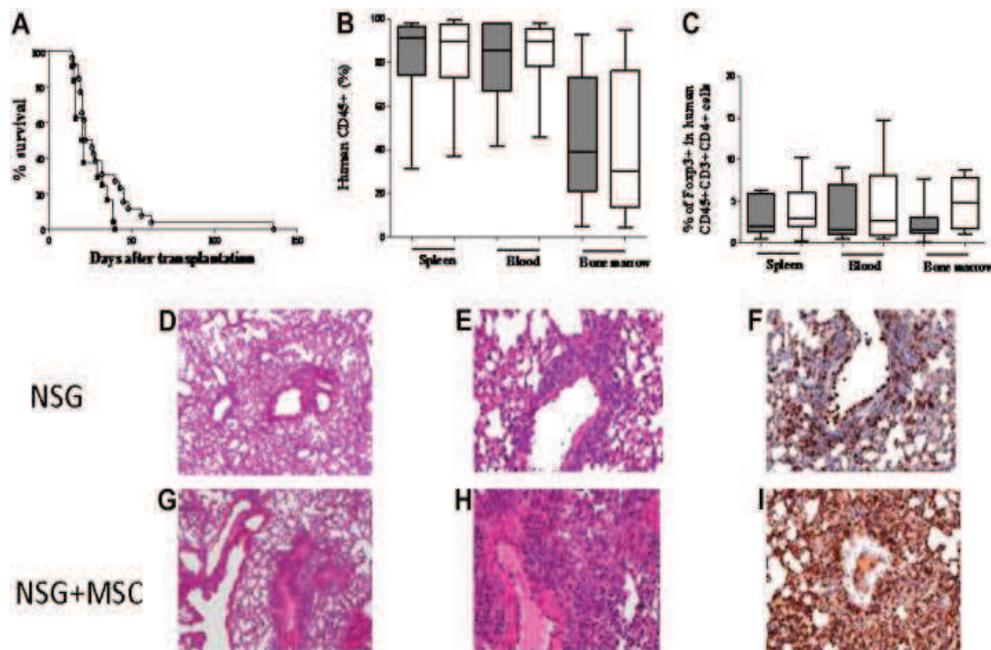


**Figure 3.** TCR  $V_{\beta}$  repertoire in PBMC before injection into NSG mice and in spleen cells collected from 5 NSG mice 13 days after IP PBMC infusion. NSG mice were irradiated at 2.5 Gy the day before PBMC injection. The number of peaks in each family was comparable among PBMC before injection (black columns) and among spleen cells (white columns) 13 days after infusion.

### MSC did not prevent xenogeneic GVHD in the NSG model

In a first set of experiments, we assessed the ability of intraperitoneal infusion of  $3 \times 10^6$  human MSCs on days 0, 7, 14 and 21 to prevent GVHD in NSG mice irradiated on day-1 at 2.5 Gy and given  $30 \times 10^6$  human PBMC IP on day 0. As shown in **Figure 4A**, there was a slight survival advantage in mice given PBMC and MSC ( $n = 26$ , median survival of 24 days) compared with control mice given

human PBMC alone ( $n = 24$ , median survival of 20.5 days,  $P = 0.03$ ), but eventually all but one of the MSC/PBMC mice died of GVHD within the first 62 days after transplantation (**Figure 4A**). The mouse that survived  $> 100$  days had signs of chronic GVHD with fur loss that started from day 60 and skin fibrosis (**Supplementary Figure 2**).



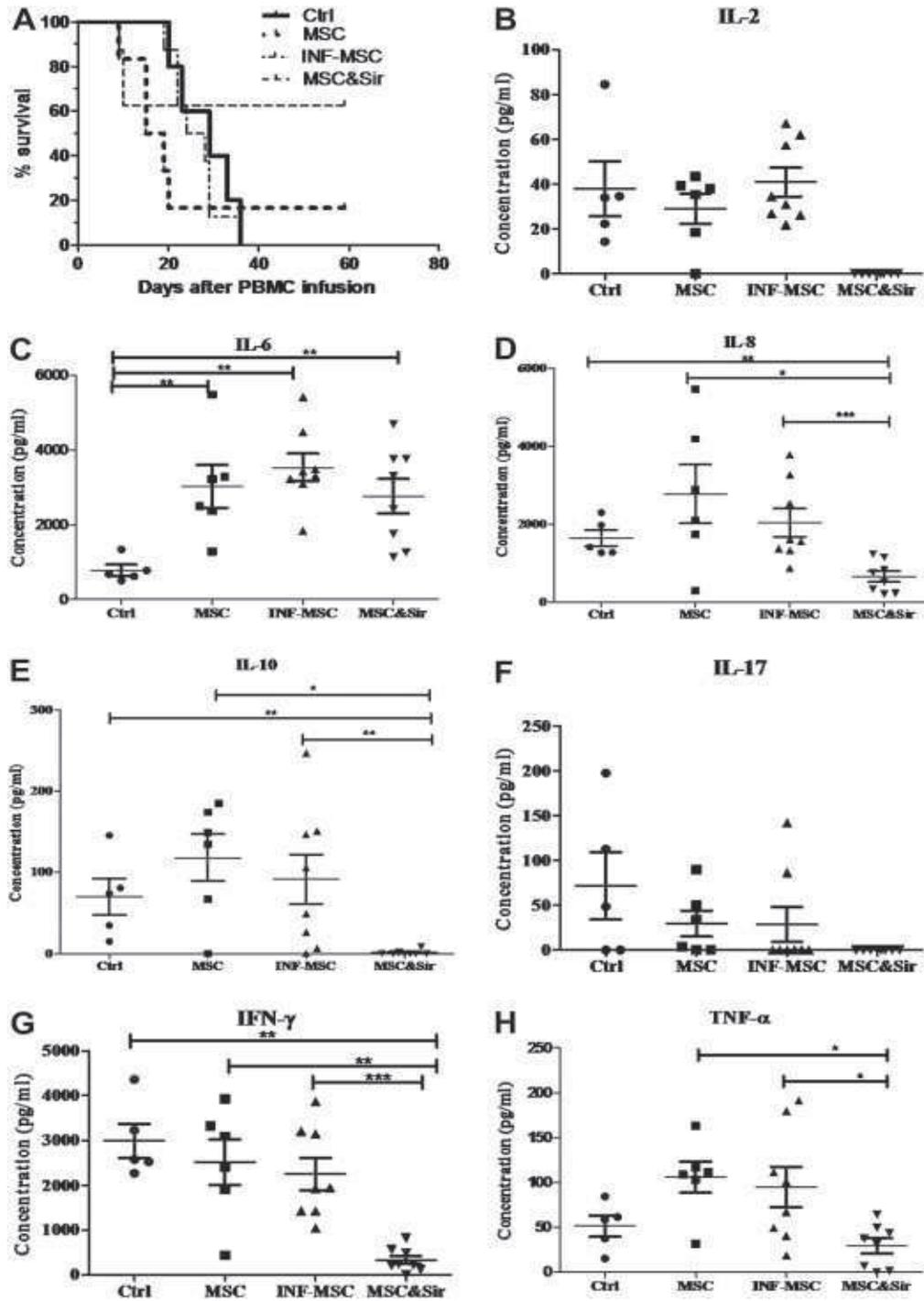
**Figure 4. Impact of IP infusion of MSC on xenogeneic GVHD in NSG mice.** NSG mice irradiated at 2.5 Gy on day-1 received  $3 \times 10^7$  PBMC IP on day 0 with or without  $3 \times 10^6$  MSC also infused IP on days 0, 7, 14 and 21. (A) Overall survival in mice given (open circles,  $n = 26$ ) or not (black squares,  $n = 24$ ) MSC. (B) Percentage of human CD45<sup>+</sup> cells in spleen ( $n = 18$  in PBMC arm vs.  $n = 12$  in MSC arm), blood ( $n = 17$  in PBMC arm vs.  $n = 11$  in MSC arm) or bone marrow ( $n = 18$  in PBMC arm vs.  $n = 9$  in MSC arm) of mice given (grey bars) or not (white bars) MSC. (C) Percentage of human Foxp3<sup>+</sup> cells among total human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells of spleen ( $n = 7$  in PBMC arm vs.  $n = 4$  in MSC arm) and blood ( $n = 5$  in PBMC arm vs.  $n = 5$  in MSC arm) of mice given (grey bars) or not (white bars) MSC. Horizontal lines represent median values of each group. (D-I) Microscopic features of the lungs at the time of necropsy in control (D-F) versus MSC mice (G-I); at low magnification (D and G, hematoxylin and eosin,  $\times 50$ ) lymphoid infiltrates with a perivascular and peribronchial distribution were observed in both groups; at high magnification (E and H, hematoxylin and eosin,  $\times 200$ ), the infiltrates were cytologically pleomorphic with a high proportion of large cells displaying mitotic activity; immunostainings with anti-human-CD3 showed a high proportion of CD3<sup>+</sup> cells of donor origin (immunoperoxidase,  $\times 200$ ).

At the time of necropsy, MSC/PBMC mice and control mice had similar infiltration by human cells in the peripheral blood (median of human CD45<sup>+</sup> cells was 90% [range, 46–98%] in MSC mice versus 86% [range, 42–98%] in control mice), in the spleen (90% [range, 37–99%] in MSC mice versus 91% [range, 31–98%] in control mice) and in the bone marrow (30% [range, 4–95%] in MSC mice versus 39% [range, 5–93%] in control mice) (**Figure 4B**).

The median frequency of Foxp3<sup>+</sup> cells among human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells infiltrating the spleen was 3% (range, 0.2–10%) in MSC/PBMC mice versus 2% (range, 0.5–6%) in control mice, 3% (range, 0.4–15%) in MSC/PBMC mice versus 2% (range, 0.4–9%) in control mice for cells present in the peripheral blood and 5% (range, 1–9%) in MSC/PBMC mice versus 2% (range, 0–8%) in control mice for cells infiltrating the bone marrow (**Figure 4C**). Microscopic examination of the tissue sections showed extensive lymphoid infiltrates with a perivascular and peribronchial distribution in the lung and in portal tracts of the liver. Cytologically, the infiltrates were pleomorphic with a high proportion of large cells displaying mitotic activity. Immunohistochemistry performed on lung sections confirmed CD3<sup>+</sup> T-cell lymphoid infiltrates comprising an admixture of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (**Figure 4D-I**).

In an additional experiment including 27 NSG mice, we analyzed the impact of MSC activation by IFN- $\gamma$  and the impact of a combination of MSC with sirolimus administration on xenogeneic GVHD and on serum cytokine levels 8 days after PBMC infusion (1 day after the second intraperitoneal MSC injection in mice given MSC). All NSG mice were irradiated at 2.5 Gy on day-1 and given  $30 \times 10^6$  PBMC IP on day 0. Five NSG mice did not receive any MSC (control mice), six mice were given  $3 \times 10^6$  MSC infused IP on days 0, 7, 14 and 21 (MSC mice), eight mice were given  $3 \times 10^6$  MSC infused IP on days 0, 7, 14 and 21 and intraperitoneal sirolimus (Rapamune), 1.5 mg/kg from day 0 to day 7 and 1 mg/kg from day 8 to day 21 after transplantation (MSC&Sir mice) and eight mice were given  $3 \times 10^6$  IFN- $\gamma$  activated MSC infused IP on days 0, 7, 14 and 21 after transplantation (IFN-MSC mice).

As shown in **Figure 5A**, neither infusion of MSC nor infusion of IFN- $\gamma$  activated MSC consistently prevented xenogeneic GVHD. However, there was a suggestion for improved survival in MSC&Sir mice (with five of eight mice surviving beyond day 62). MSC infusion increased the serum levels of IL-6 on day 8 but had no statistically significant impact on IL-2, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  on that day (serum IL-4 and IL-15 levels were low in all mice groups). In contrast, administration of MSC together with sirolimus resulted in lower serum levels of IL-8, IL-10 and IFN- $\gamma$  (but higher levels of IL-6) compared with control mice and lower levels of IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  compared with MSC mice on day 8 after transplantation. All MSC&Sir mice had undetectable levels of IL-17 and IL-2 (**Figure 5B-H**).



**Figure 5. Impact of IFN- $\gamma$  activation of MSC and of administration of sirolimus with MSC on xenogeneic GVHD and on human serum cytokine levels.** NSG mice were irradiated at 2.5 Gy on day-1 and given  $30 \times 10^6$  PBMC IP on day 0. Five NSG mice did not receive any MSC (control mice), six mice were given  $3 \times 10^6$  MSC also infused IP on days 0, 7, 14 and 21 (MSC mice), eight mice were given  $3 \times 10^6$  MSC also infused IP on days 0, 7, 14 and 21 and IP sirolimus (1.5 mg/kg from day 0 to day 7 and 1 mg/kg from day 8 to day 21) after PBMC infusion (MSC&Sirol mice), while eight mice were given IFN- $\gamma$  activated  $3 \times 10^6$  MSC also infused i.p. on days 0, 7, 14 and 21 after PBMC infusion (INF-MSC mice). **A**) Survival curve. **B-H**) Serum cytokines levels on day 8 after PBMC infusion. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

In a second set of experiments, we investigated whether repeated intravenously (IV) infusion of MSC ( $3 \times 10^6$  cells) on days 0, 7, and 14 could prevent xenogeneic GVHD in NSG mice given 2.5 Gy TBI on day -1, and human PBMC ( $30 \times 10^6$  cells) IP on day 0. Six mice received MSC a few hours before PBMC and 5 mice received only PBMC. As observed with IP injection of MSC, IV infusion of MSC failed to prevent GVHD with MSC/PBMC mice ( $n = 6$ ) dying on days 6, 14, 16, 19, 23 and 29 after transplantation and control mice ( $n = 5$ ) dying on days 22, 25, 25, 34 and 34. On day 14, because of the quantity and size of MSC of GVHD, it was difficult to inject the totality of  $3 \times 10^6$  MSC. Indeed, one mouse survived after receiving the complete dose while one mouse died immediately after the injection (possibly due to pulmonary embolism), and a third mouse died 2 days later (also probably of pulmonary embolism since the mouse had a brief cardiac arrest at the time of MSC injection). The three remaining mice were not injected. On day 21, mice were too sick to receive an IV injection of MSC. Further, as observed with IP infusion of MSC, MSC infused IV failed to decrease infiltration by human cells in the blood, bone marrow and spleen (data not shown).

#### **Detection of engraftment/homing of MSC in NSG mice suffering from xenogeneic GVHD**

We next analyzed the engraftment and homing of MSCs in NSG mice with xenogeneic GVHD, based on the detection of human SRY by nested PCR. MSC engraftment and homing was analyzed in eight NSG mice irradiated with 2.5 Gy and given  $3 \times 10^6$  MSC derived from male donors on days 0, 7 and 14 (total dose  $12 \times 10^6$  cells) and  $30 \times 10^6$  PBMC from female donors on day 0, all cells being injected IP. Eight mice were analyzed, and evidence for cells of male origin was demonstrated only in one of the eight mice in the bone marrow and peritoneal fluid on day 19 after transplantation (data not shown).

## **DISCUSSION**

Studies assessing the ability of MSC to prevent or to treat acute GVHD in animal models and in humans have yielded conflicting results; however, they have demonstrated that MSC infused *in vivo* acted mainly by secreting immunoregulatory agents and not through engraftment and differentiation in tissues affected by GVHD [30, 37]. These observations have important implications because they stress that factors, such as MSC origin, culture conditions, type of serum used and extent of *ex vivo* expansion that could affect the MSC secretion profile are also likely to have an impact on the activity of MSC *in vivo*. This possibility prompted us to develop two models of xenogeneic GVHD in immunodeficient mice and to test the ability of human MSC infused IP to prevent xenogeneic GVHD.

In a first step, we developed a model of xenogeneic GVHD in NOD/SCID mice, based on previous work by other groups of investigators in SCID or NOD/SCID mice [38, 39]. This model induced high

levels of human chimerism in the spleen but a lower level in the bone marrow. All tested mice died within the first 30 days after transplantation with evidence of xenogeneic GVHD. However, this model has some limitations, including the high number of human PBMC needed to induce lethal xenogeneic GVHD and the relatively low percentage of human cells in the bone marrow of transplanted mice. We developed another model of xenogeneic GVHD in a more immunodeficient mouse strain (NSG mice) [36, 40]. These mice present several advantages compared with other immunodeficient mice because they lack T-, B- and NK-cell function and have reduced macrophage and dendritic cell functions [36, 40]. As expected, a smaller number of human PBMC was needed to induce xenogeneic GVHD in this model. This model also allowed reaching higher human chimerism levels in the bone marrow, and all tested mice died with histopathologic and flow cytometry evidence of massive organ infiltration by human cells. These results are consistent with the observations of Ito *et al.* [41], who reported that intraperitoneal infusion of  $1 \times 10^7$  human PBMC induced lethal xenogeneic GVHD in all tested mice and that lower numbers of human PBMCs were needed to induce lethal GVHD in NSG mice than in NOD/SCID or BALB/cA-RAG2<sup>null</sup> mice.

The main observation of the current study was that intraperitoneal bone marrow-derived MSC infusion failed to prevent mortality from xenogeneic GVHD both in the NOD/SCID and in the NSG mouse models, whereas flow cytometry analysis and histology at the time of necropsy revealed similar infiltration by human T cells and similar frequency of regulatory T cells in MSC-infused mice and control mice. This observation held true even when multiple infusions of MSC were performed. These results are in contrast to our *in vitro* data showing that MSC, even at low MSC/PBMC ratios, decreased T-cell proliferation [as observed previously by others [9] and to observations by Tisato *et al.* [42] showing that intravenous infusion of four doses of MSC at weekly intervals (total dose,  $12 \times 10^6$  MSC) prevented the development of xenogeneic GVHD in NOD/SCID mice given  $2 \times 10^7$  human PBMCs intravenously after 2.5 Gy TBI. The discrepancies between the current study and the study by Tisato *et al.* [42] could be related to the fact that we induced a more aggressive xenogeneic GVHD in our two models by infusing higher numbers of human PBMC. However, although aggressive, preliminary data from our group suggest that xenogeneic GVHD in NSG mice could be prevented or significantly delayed by the administration of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus or by infusion of regulatory T cells [43], demonstrating that the models developed were not too aggressive to prevent any success in preventing or attenuating GVHD signs. Another possible explanation is that we used bone marrow-derived MSC, whereas Tisato *et al.* [42] used cord blood-derived MSC. *In vitro* inhibition of T-cell proliferation by bone marrow-derived MSC in the current study was significantly lower than what was observed by Tisato *et al.* [42] using cord blood-derived MSC. Further studies comparing the ability of multiple MSC products from multiple sources

and culture conditions to attenuate xenogeneic GVHD are needed to identify the best MSC product to test in future large clinical trials.

Activation of MSC by IFN- $\gamma$  did not significantly increase ability of MSC to prevent xenogeneic GVHD, whereas five of eight mice given MSC and a 21-day administration of sirolimus survived beyond day 62 after transplantation. Further studies are needed to determine whether sirolimus and MSC are synergistic (or not) to prevent xenogeneic GVHD, although the survival rate in MSC&Sir mice in the current study seems comparable to what we have previously observed with sirolimus administration alone [43].

Infusion of MSC resulted in increased serum levels of IL-6 (in agreement with the large secretion of IL-6 by MSC *in vitro* [31]) but had no statistically significant impact on IL-2, IL-17, TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  levels. In contrast, sirolimus administration in MSC mice resulted in lower levels of IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  compared with MSC mice given MSC but no sirolimus, demonstrating the impact of sirolimus administration on cytokine serum levels as observed by other investigators [44].

We chose to infuse MSC mainly IP to avoid the risk of pulmonary embolism associated with intravenous infusion of large amounts of MSC and to avoid direct homing of the MSC to the lungs, which is one of the targets of xenogeneic GVHD. This route of MSC administration has been shown to be effective in a murine model of GVHD [17]. We observed that MSC infused IP in NOD/SCID mice were able to migrate into several organs including bone marrow. However, we failed to demonstrate DNA of MSC donor origin at the sites of xenogeneic GVHD in NSG mice infused with human PBMCs and human MSC, despite the use of a sensitive technique. This observation is in agreement with the current thinking that MSC do not prevent GVHD through engraftment and differentiation at the sites targeted by GVHD [30]. Finally, similar to what was observed with intraperitoneal infusion, intravenous infusion of MSCs also did not prevent GVHD in the two tested mouse models.

In conclusion, we have developed two robust models of xenogeneic GVHD. Although MSC infusions failed to prevent xenogeneic GVHD in these two models, further studies are needed to investigate whether modulation of MSC secretion activity (i.e., by transfecting the cells with inhibitory cytokine genes [45] or by using MSC obtained from other sources or after other culture conditions optimized for *in vitro* immunosuppression) could increase efficacy of MSC in prevention of xenogeneic GVHD.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by funds from the National Fund for Scientific Research (FNRS), the fund Leon Fredericq and Anti-Cancer Center at the University of Liège and the Belgian Federation Against Cancer. FBr, LB and MH are Télévie Research Assistants, SHB is postdoctoral researcher and FBa is senior research associate of the National Fund for Scientific Research (FNRS) Belgium. We are very grateful to Pierre Drion for his help with the mouse experiments and to Sandra Ormenese from the Imaging and Flow Cytometry Platform of the GIGA for help with flow cytometry analyses. We are also grateful to Olivier Dengis, Amélie Halleux and Coline Daulne for excellent technical assistance.

## **REFERENCES**

1. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007 May 15;109(10):4119-26.
2. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Sorror M, Diaconescu R, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2005 Mar 20;23(9):1993-2003.
3. Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL, Weisdorf D. GVHD: A Continuing Barrier to the Safety of Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009 Jan;15(1):162-8.
4. Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C, et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 2012 May 22.
5. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Review). *Blood* 2001 Dec 1;98(12):3192-204.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
7. Noort WA, Kruisselbrink AB, In't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002 Aug;30(8):870-8.
8. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002 May 15;99(10):3838-43.
9. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003 Jan;57(1):11-20.
10. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003 May 1;101(9):3722-9.
11. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005 May;11(5):321-34.
12. Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007 Nov;262(5):509-25.

## -Section expérimentale: Partie I-

---

13. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
14. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002 Jan;30(1):42-8.
15. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006 Nov;24(11):2582-91.
16. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol* 2008 Jun;38(6):1745-55.
17. Christensen ME, Turner BE, Sinfield LJ, Kollar K, Cullup H, Waterhouse NJ, et al. Mesenchymal stromal cells transiently alter the inflammatory milieu post-transplant to delay graft-versus-host disease. *Haematologica* 2010 Dec;95(12):2102-10.
18. Sudres M, Norol F, Trenado A, Gregoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2006 Jun 15;176(12):7761-7.
19. Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, Eizik O, Morecki S, Slavin S. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol* 2008 Oct;36(10):1370-6.
20. Badillo AT, Peranteau WH, Heaton TE, Quinn C, Flake AW. Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2008 Apr;141(2):224-34.
21. Mielcarek M, Storb R, Georges GE, Golubev L, Nikitine A, Hwang B, et al. Mesenchymal Stromal Cells Fail to Prevent Acute Graft-versus-Host Disease and Graft Rejection after Dog-Leukocyte-Antigen Haploidentical Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(2):214-25.
22. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006 Apr;24(4):1095-103.
23. Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bulle H, Woite C, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 2011 Apr;25(4):648-54.
24. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007 Oct 1;110(7):2764-7.
25. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008 May 10;371(9624):1579-86.
26. Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008 Mar;22(3):593-9.
27. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(2):200-7.
28. Baron F, Lechanteur C, Willems E, Bruck F, Baudoux E, Seidel L, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 Jun;16(6):838-47.

29. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, Klingemann H, Waller EK, Daly AS, et al. Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(supplement 2):S169-S170.
30. Horwitz EM, Maziarz RT, Kebriaei P. MSCs in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011 Jan;17(1 Suppl):S21-S29.
31. Briquet A, Dubois S, Bekaert S, Dolhet M, Beguin Y, Gothot A. Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages. *Haematologica* 2010 Jan;95(1):47-56.
32. Pirson L, Baron F, Meuris N, Giet O, Castermans E, Greimers R, et al. Despite inhibition of hematopoietic progenitor cell growth in vitro, the tyrosine kinase inhibitor imatinib does not impair engraftment of human CD133+ cells into NOD/SCIDbeta2mNull mice. *Stem Cells* 2006 Jul;24(7):1814-21.
33. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998 Apr;62(4):768-75.
34. Castermans E, Baron F, Willems E, Schaaf-Lafontaine N, Meuris N, Gothot A, et al. Evidence for neo-generation of T cells by the thymus after non-myeloablative conditioning. *Haematologica* 2008 Feb;93(2):240-7.
35. Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, Humblet-Baron S, Seidel L, Cheynier R, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* 2011 Feb;96(2):298-306.
36. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(null)(c) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002 Nov 1;100(9):3175-82.
37. Baron F, Storb R. Mesenchymal Stromal Cells: A New Tool against Graft-versus-Host Disease? *Biol Blood Marrow Transplant* 2012 Jun;18(6):822-40.
38. Tsuchida M, Brown SA, Tutt LM, Tan J, Seehafer DL, Harris JP, et al. A model of human anti-T-cell monoclonal antibody therapy in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *Clin Transplant* 1997 Oct;11(5):522-8.
39. Sandhu JS, Gorczynski R, Shpitz B, Gallinger S, Nguyen HP, Hozumi N. A Human-Model of Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease in Scid Mice Engrafted with Human Peripheral-Blood Lymphocytes. *Transplantation* 1995 Jul 27;60(2):179-84.
40. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K, et al. Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34(+) cells using the NOD/SCID/gamma c(null) mice model. *Blood* 2003 Aug 1;102(3):873-80.
41. Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, et al. Highly Sensitive Model for Xenogenic GVHD Using Severe Immunodeficient NOG Mice. *Transplantation* 2009 Jun 15;87(11):1654-8.
42. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007 Sep;21(9):1992-9.
43. Bruck F, Baron F, Dubois S, Briquet A, Hanon-Absil M, Belle L, et al. Rapamycin Delays Xenogeneic Acute Graft Versus Host Disease (Agvhd) in Nod/Scid/Il2R Gamma Null (Nsg) Mice: Impact of Regulatory T Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011 Feb;17(2):S332.
44. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010 Aug;62(8):2476-87.

45. Min CK, Kim BG, Park G, Cho B, Oh IH. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007 May;39(10):637-45.

## -Section expérimentale: Partie I-

**Table 1. Human engraftment (at the time of necropsy) in NSG mice according to the number of human PBMC infused.**  
All NSG mice were irradiated on day-1 at the dose of 2.5 Gy.

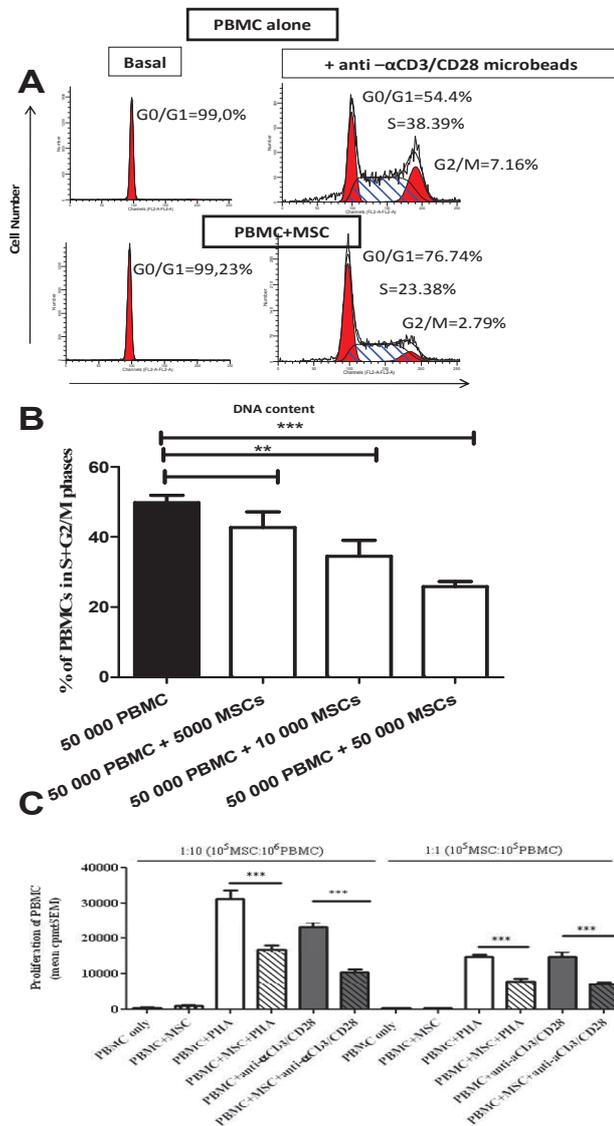
# of PBMC injected (x 10 <sup>6</sup> ) IP.	% human cells in the blood; median (range)				% human cells in the BM; median (range)				% human cells in the spleen; median (range)			
	CD45	CD3	CD4	CD8	CD45	CD3	CD4	CD8	CD45	CD3	CD4	CD8
10 (n=5)	63 (39-92)	61 (36-86)	50 (17-60)	15 (9-37)	55 (8-74)	53 (7-68)	32 (4-39)	14 (3-20)	65 (45-88)	64 (45-83)	34 (23-44)	20 (18-44)
20 (n=3*)	87 (87-89)	86 (81-87)	51 (47-53)	26 (17-27)	71 (38-83)	68 (37-78)	42 (25-56)	18 (10-21)	70 (65-71)	67 (63-68)	29 (26-39)	23 (17-36)
30 (n=3*)	95 (76-99)	87 (63-95)	35 (16-35)	37 (21-49)	72 (19-80)	69 (19-80)	20 (10-31)	31 (7-37)	89 (78-95)	85 (77-87)	39 (25-46)	30 (30-50)
50 (n=3*)	84 (32-90)	81 (31-84)	48 (26-55)	19 (5-28)	28 (8-44)	26 (8-44)	20 (4-31)	5 (3-10)	76 (32-86)	75 (29-86)	40 (23-51)	29 (5-35)

All NSG mice were irradiated on day-1 at the dose of 2.5 Gy.

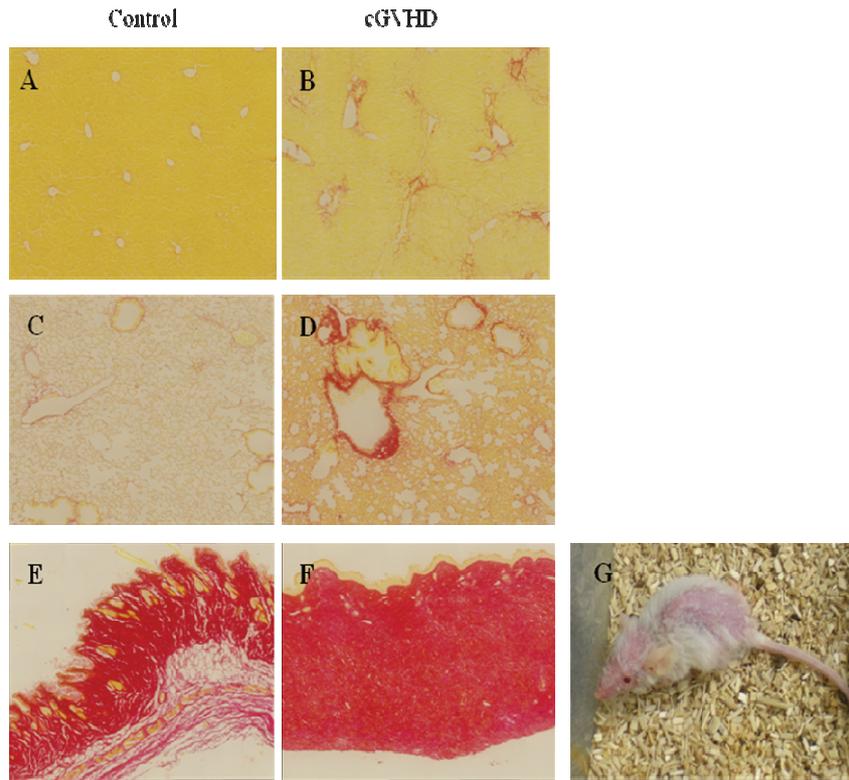
BM: bone marrow; IP: intraperitoneal; PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

\* Two of 5 mice could not be processed.

**SUPPLEMENTARY DATA**



**Supplementary Figure 1: Inhibition of PBMC proliferation by third party MSC.** (A) Representative histogram of PBMC in different phases of the cell cycle obtained with Modfit Software. Left histograms represent the cell cycle of PBMC alone or with MSC used as negative controls and right histograms PBMC stimulated with anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads without or with MSC. (B) 50 000 PBMC were stimulated with anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads during 4 days with or without irradiated (25 Gy) MSC (10, 2, or 1 PBMC/MSC ratios) added at the beginning of the culture. Proliferation was assessed by analysis of the cell cycle by flow cytometry. Results of five independent experiments were expressed as the mean ( $\pm$  SEM) of the percentages of cells present in S + G2M phases. \*,  $P < 0.05$ . (C) PBMC proliferation assessed with  $^3$ [H]-Thymidine incorporation.  $1 \times 10^5$  or  $1 \times 10^6$  PBMC were stimulated with anti- $\alpha$ CD3/CD28 microbeads or PHA (10  $\mu$ g/ml) with or without added irradiated (25 Gy) MSC ( $1 \times 10^5$  cells).  $^3$ [H]-Thymidine incorporation was measured after 4 days of culture and data were expressed as mean cpm ( $\pm$  SEM). Data from 6 independent experiments are presented.



**Supplementary Figure 2. Chronic GVHD in NSG mice.** The NSG mouse who survived more than 100 days after human PBMC and MSC IP infusion had signs of chronic GVHD with a fur loss that started from day 60. (A) Liver, (C) lung, and (E) skin of a control NSG mouse. (B) Liver of the mouse with chronic GVHD showing extensive collagen filaments. (D) Lungs of the mouse with chronic GVHD showing high amounts of collagen around blood vessels. (F) Skin of the mouse with chronic GVHD showing skin collagen extending into the subcutaneous fatty tissue. Original pictures captured with FSX Olympus at 20× magnification. (G) Picture on day 126 after transplantation of the mouse that died 136 days after PBMC and repeated MSC transplantation. This mouse presented signs of chronic GVHD such as an important loss of fur and skin fibrosis.

**Supplementary Table 1. Homing of MSC injected i.p. in NOD/SCID mice.**

	1 day after MSC i.p. infusion			7 days after MSC i.p. infusion				14 days after MSC i.p. infusion			
	M. #1	M. #2	M. #3	M. #1	M. #2	M. #3	M. #4	M. #1	M. #2	M. #3	M. #4
<b>BM</b>	-	-	-	++	+	+	++	++	-	++	+
<b>Liver</b>	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lungs</b>	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
<b>Spleen</b>	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	+	+
<b>Small bowel</b>	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-
<b>Kidney</b>	-	+	-	+++	++	-	-	-	++	+++	-

+++ , Δ CT -12 to -16; ++, Δ CT -16 to -17; +, Δ CT -17 to -18.





# **Section expérimentale**

## **Partie II**

## The mTor inhibitor rapamycin delays xenogeneic graft-versus-host disease (xGVHD) in NSG mice

France Bruck<sup>1</sup>, Sophie Dubois<sup>1</sup>, Alexandra Briquet<sup>1</sup>, Muriel Hannon<sup>1</sup>, Ludovic Belle<sup>1</sup>, Yves Beguin<sup>1,2</sup>, Stéphanie Humblet-Baron<sup>1,3</sup>, and Frédéric Baron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)-P3, University of Liège, Liège, Belgium; <sup>2</sup>Department of Medicine, Division of Hematology, CHU of Liège, Liège, Belgium;

<sup>3</sup>Currently in the Autoimmune Genetics Laboratory, University of Leuven, Leuven, Belgium.

**Ce travail fait l'objet d'analyses complémentaires.**

### ABBREVIATIONS:

APC: allophycoerythrin

TCR: T-cell receptor

FITC: fluorescein isothiocyanate

TNF: tumor necrosis factor

Foxp3: forkhead box passage 3

Treg: regulatory T cells

i.p.: intraperitoneally

xGVHD: xenogeneic graft-versus-host disease

i.v.: intravenously

IFN: interferon

IL: interleukin

mTOR: mammalian target of rapamycin

NOD/SCID: non-obese diabetic/severe combined immunodeficient

NSG: NOD/SCID/interleukin-2R $\gamma$ <sup>null</sup>

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PBS: phosphate-buffered saline

PE: phycoerythrin

PerCP: peridin chlorophyll protein

RAPA: rapamycin

TBI: total body irradiation

## ABSTRACT

### Background aims

Rapamycin (Sirolimus; RAPA) is an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTor) which can induce tolerance by inhibiting activated T cells without diminishing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) proliferation and suppressive function. The aim of the current study was to assess the impact of RAPA administration on xenogeneic graft-versus-host disease (xGVHD) in NSG mice.

### Methods

NSG mice were given 2.5 Gy total body irradiation on day-1 and an intravenously (i.v.) injection of  $2 \times 10^6$  human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on day 0. RAPA was administered intraperitoneally (i.p.) five days/week at a dose of 1.5 mg/kg from day -1 to day 14, and at 1 mg/kg from day 15 to day 21.

### Results

RAPA administration was associated with a lower proportion of conventional T cell in cell cycle on day 20 after transplantation and a reduction in xGVHD lethality. The beneficial impact of RAPA on survival was significantly decreased when CD25-depleted PBMC were transplanted instead of unmanipulated PBMC, suggesting that the beneficial effect of RAPA was mediated at least in part by Treg. However, RAPA did not induce long-term tolerance since RAPA treated mice that survived beyond day 60 developed signs of chronic GVHD.

### Conclusions

RAPA administration for 3 weeks prevented/delayed xGVHD in NSG mice given human PBMC without inducing permanent tolerance.

**Key words:** *graft-versus-host disease, GVHD, rapamycin, Treg, xenogeneic, NSG mice*

## INTRODUCTION

Severe acute graft-versus-host disease (GVHD) remains a major limitation of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [1]. Current standard of care for GVHD prevention consist of in the combination of a calcineurin inhibitor (ciclosporin or tacrolimus) and an antimetabolite (methotrexate or mycophenolate mofetil) [2]. However, despite these associations, the incidence of severe (grade III-IV) acute GVHD in patients given HLA-matched peripheral blood stem cells remains relatively high, ranging from 5 to 25 % [2].

Rapamycin (Sirolimus; RAPA) is an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). In vitro, RAPA inhibits conventional T-cell activation and differentiation, induces T-cell anergy as well as de novo expression of FoxP3 by conventional T cells (induced regulatory T cells (iTreg), but has only a limited negative impact on natural Treg proliferation [3-6]. In vivo, RAPA administration prevents acute GVHD and promotes Treg expansion in murine models of GVHD [7-9], and prevents graft rejection in a canine model of nonmyeloablative transplantation [10]. Based on these results, GVHD prevention with a combination of RAPA and a calcineurin inhibitor is currently under investigation in large clinical trials.

We and other groups of investigators have developed a humanized model of xenogeneic GVHD (xGVHD) by infusing human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) into NOD-scid IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  (NSG) mice [11, 12]. In this model, the severity of GVHD correlates closely with the dose and route of PBMC infused, and is caused by the expansion of effectors memory T-cells [11, 12]. Here, we investigate the impact of rapamycin administration on the development of xGVHD in NSG mice.

## METHODS

### Cell isolation

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were isolated by centrifugation over Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus density gradient (GE Healthcare UK Ltd., England) and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) (Lonza, Verviers, Belgium). Cells were counted with an HORIBA ABX<sup>®</sup> automatic cell counter (ABX Hematology, Montpellier, France) and resuspended in PBS.

### Mice

NOD-scid IL-2R $\gamma^{\text{null}}$  (NSG) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Mice were maintained in sterilized cages and fed with sterilized food and water. Manipulations were performed in a laminar flow hood. Water was changed three times per week and was

supplemented with antibiotics. Mice were transplanted between 7-10 weeks of age. All animal protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Liege.

### **Model of xGVHD**

Mice were irradiated with 2.5 Gy total body irradiation using a  $^{137}\text{Cs}$  source one day before intravenous (i.v.) injection via the tail vein of PBMC obtained from healthy volunteers. In a first series of experiments, 4 doses of human PBMCs ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  or  $3 \times 10^6$ ) were infused in order to test their ability to induce xGVHD. In some experiments, PBMC were depleted of CD25<sup>+</sup> cells by negative selection using anti-human CD25-magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and LS separation columns (Miltenyi Biotec). In additional experiments, NSG mice were given i.p. sirolimus 5 days / week (RAPA, Rapamune<sup>®</sup> at 1.5 mg/kg from day 0 to day 14 and 1 mg/kg from day 15 to day 21). All mice were tagged on day 0 and evaluated at least 5 times/week after transplantation for evidence of xGVHD assessed by four clinical parameters: posture (hunching), activity, fur texture, and skin integrity. Further, mice were weighted twice a week. Mice were labeled as having developed lethal GVHD and sacrificed when they had severe weight loss (> 10%) and anemia, reduced mobility, and tachypnea [13]. Sacrificed mice were examined for human cell infiltration by flow cytometry, histology, and immunochemistry.

### **Flow cytometry analysis**

The following antibodies, specific for human cell surface antigens, were used: V500-conjugated (SP34-2 clone) or allophycoérythrine (APC)-conjugated anti-CD3, peridin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated (SK3 clone) or efluor 450 (RPA-T4 clone) conjugated anti-CD4, PerCP-conjugated (2D1 clone) or Pe-Cy7 conjugated (HI30 clone) anti-CD45, PE-conjugated anti-CD25 (BC96 clone), efluor 450-conjugated anti-CD127 (eBioRDR5 clone). Human intracellular transcription factor forkhead box P3 (Foxp3) staining kit containing AlexaFluor<sup>®</sup> 488 anti-Foxp3 (206D clone), isotype-matched control IgG, Fix/Perm solution, and Fix/Perm buffer was purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Foxp3 intracellular staining was performed according to the manufacturer's instructions. APC-conjugated anti-human intracellular KI67 (B56 clone) (eBioscience) staining was performed similarly to Foxp3 intracellular staining. Data were acquired on a FACS Canto flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with the Flowjo software 7.0 (Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA).

### **Histology and immunochemistry**

Liver, lungs, and skin were harvested, washed with PBS and fixed in 10% formalin (Sigma Aldrich) solution before being embedded in paraffin, while 5- $\mu\text{m}$  sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) for histological examination. Further, 5- $\mu\text{m}$  sections of the liver and lungs were air dried and

stained with anti-human CD45 antibodies (2B11+PD7/26 clone) (DakoCytomation) according to the manufacturer's instructions. Endogenous peroxidase was blocked by hydrogen peroxidase in a sodium-citrate buffer containing sodium azide. Subsequently, sections were analyzed with a Zeiss KS400 microscope. To assess the extent of collagen deposits, sections of liver, lungs, and skin from mice presenting symptoms of cGVHD were stained with sirius red (consisting of 0.1% sirius red and 0.1% picric acid). Staining was performed by placing slides in different successive baths for different times at room temperature. Sections were examined using an Olympus microscope FSX100 at  $\times 20$  magnification (Olympus, Aartselaar, Belgium).

### **CDR3 spectratyping (immunoscope)**

T-cell receptor beta chain (TCR  $V_{\beta}$ ) CDR3 spectratyping analyses were performed on cells from mice of the RAPA and control groups sacrificed on day 13 after transplantation. RNA was extracted from  $10 \times 10^6$  cells by Tripure (Roche) according to the manufacturer's protocol. The quality of the extracted RNA was controlled using the Experion RNA StdSens Starter Kit (Bio-Rad, Nazareth Eke, Belgium) in a gel electrophoresis experiment (Experion Automated Electrophoresis System, Bio-Rad). RNA optical density measurements were performed on a Nanodrop ND1000 (Isogen, Sint-Pieters Leeuw, Belgium). First-strand cDNA was generated from 1  $\mu$ g total RNA using Transcriptor 1st strand cDNA synthesis kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Each TCR  $V_{\beta}$  segment was amplified with one of the 24 TCR  $V_{\beta}$  family-specific primers ( $V_{\beta}$  1- $V_{\beta}$  24) and a TCR  $V_{\beta}$  primer conjugated to fluorescent dye 6-FAM (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) for CDR3 analysis. The size distribution of each fluorescent PCR product was determined by electrophoresis on an ABI 3730 automatic capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and data were analyzed by Genemapper v4.0 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Emeryville, CA, USA). The overall complexity within a TCR  $V_{\beta}$  subfamily was determined by counting the number of peaks (intervals of 3 nucleotides) per subfamily.

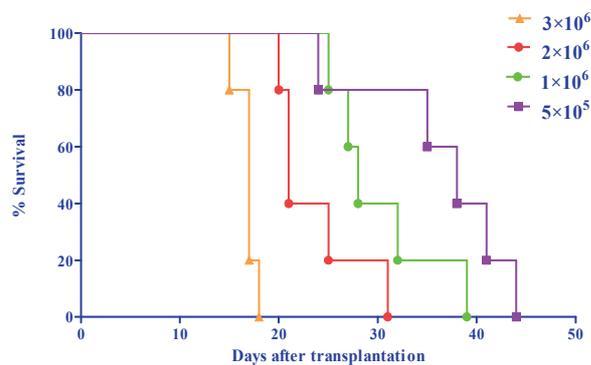
### **Statistics**

Statistical analyses were performed with the GraphPad<sup>®</sup> Prism 5.00 Software. The Mann-Whitney test was used to assess the impact of RAPA on cell proliferation *in vitro*, and the percentages of human cells at necropsy between the different groups of mice. Survival curves were modelled using the Kaplan-Meier method. Comparisons between groups were made with the log-rank test. All *P* values were two-sided. *P* values  $< 0.05$  were considered as statistically significant.

## RESULTS

### Development of xGVHD in NSG mice

To determine the effect of PBMC dose on xGVHD development, NSG were irradiated with 2.5 Gy TBI one day before i.v. injection of  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ , or  $3 \times 10^6$  human PBMC. As shown in **Figure 1**, there was a strong correlation between survival and the dose of PBMC administered ( $P < 0.001$ ). Specifically, all mice given  $\geq 2 \times 10^6$  PBMC developed xGVHD and died within the first 31 days after PBMC transplantation.

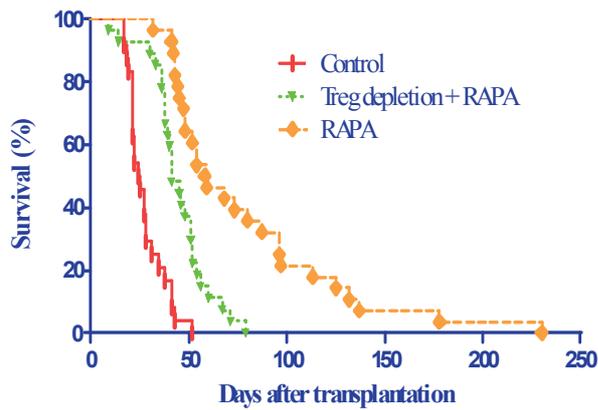


**Figure 1. Impact of the dose of PBMC transplanted on xGVHD.** NSG mice were irradiated with 2.5 Gy TBI 1 day before i.v. injection of  $3 \times 10^6$  ( $n = 5$ ),  $2 \times 10^6$  ( $n = 5$ ),  $1 \times 10^6$  ( $n = 5$ ) or  $5 \times 10^5$  ( $n=5$ ) PBMC. Median survival times were 17, 21, 28 and 38 days ( $P < 0.001$ ), respectively.

### RAPA delays xGVHD in NSG mice

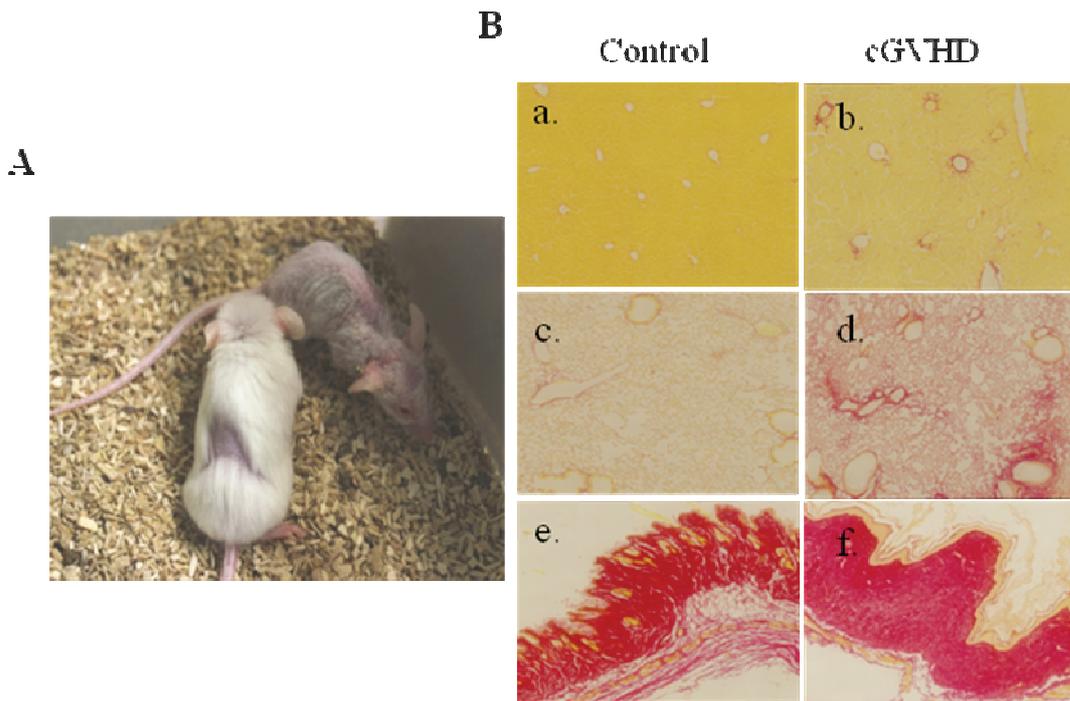
We then assessed the impact of RAPA administration as well as the impact of RAPA administration and Treg depletion (via CD25-depletion) on xGVHD with the aim of determining whether the potential beneficial impact of RAPA was driven (at least partly) by Treg. Data from 6 consecutive independent experiments were combined. NSG mice were irradiated with 2.5 Gy one day before i.v. injection of  $2 \times 10^6$  PBMC + PBS (control group,  $n = 24$ ),  $2 \times 10^6$  PBMC + RAPA (RAPA group,  $n = 28$ ), or  $2 \times 10^6$  PBMC depleted of CD25<sup>+</sup> cells to remove natural Treg + RAPA (Treg depletion + RAPA group,  $n = 26$ ).

As observed in **Figure 2**, survival was significantly shorter in controls (median survival 24.5 days) than in RAPA mice (median survival 58.5 days,  $P < 0.0001$ ). Interestingly, survival in the Treg depletion + RAPA group (median survival 41 days) was significantly shorter than in the RAPA group ( $P < 0.0001$ ), demonstrating that the beneficial impact of RAPA was mediated at least in part by Treg.



**Figure 2. Impact of RAPA administration and RAPA administration with Treg depletion on survival.** NSG mice were irradiated with 2.5 Gy on day-1, and infused on day 0 with  $2 \times 10^6$  PBMC i.v. plus i.p. PBS from day 0 to day 21 (control group,  $n = 24$ ),  $2 \times 10^6$  PBMC i.v. plus i.p. RAPA given 5 days/week at 1.5 mg/kg from day 0 to day 7 and at 1 mg/kg from day 8 to day 21 (RAPA group,  $n = 28$ ), or  $2 \times 10^6$  CD25-depleted PBMC i.v. plus i.p. RAPA as described above (Treg depletion + RAPA group,  $n = 26$ ). Data from 6 independent experiments are combined.

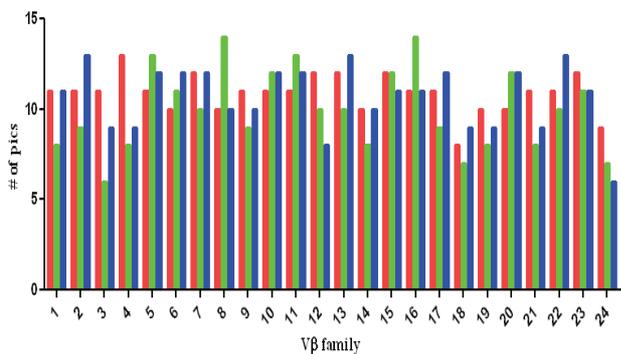
Interestingly, 10/28 mice in the RAPA group developed signs of chronic xGVHD (hair loss, fibrosis of ear and tail) starting  $\geq 60$  days after transplantation, with demonstration of fibrosis in the skin, liver and lungs at necropsy (**Figure 3**).



**Figure 3. Development of sclerodermic xenogeneic chronic GVHD in RAPA mice.** Starting from day 60 after transplantation, 10 of 28 RAPA mice developed signs of chronic sclerodermic GVHD (hair loss, and fibrosis of the ears and tail). **A.** To the left of the picture: mouse beginning to lose its hair in the back; right of the picture: mouse having lost all its hair. **B.** Histology of chronic xGVHD. Liver (a), lung (c) and skin (e) from a control mouse (irradiated with 2.5 Gy and receiving PBS). (b) Liver from a mouse that developed chronic GVHD showing extensive collagen filaments. (d) Lung from a mouse that developed chronic GVHD showing collagen disposed around blood vessels. (f) Skin from a mouse that developed chronic GVHD showing collagen deposits that extended into the subcutaneous fat tissue. Original pictures captured with FSX Olympus at magnification  $\times 20$

### RAPA does not affect the diversity of the TCR V $\beta$ repertoire

To evaluate whether RAPA treatment impacted T-cell receptor V $\beta$  (TCR V $\beta$ ) repertoire diversity, we assessed TCR V $\beta$  repertoire in PBMC before i.v. injection into NSG mice and in spleen cells collected 10 days after i.v. PBMC infusion from NSG mice treated or not with RAPA. As shown in **Figure 4**, the number of peaks in each family was comparable among PBMC before injection (median of 11 peaks/V $\beta$  family) and spleen cells from control (median of 10 peaks/V $\beta$  family) and RAPA (median of 11 peaks/V $\beta$  family) mice, demonstrating the persistence of a diverse T-cell repertoire after in-vivo injection of PBMC that was not affected by RAPA.

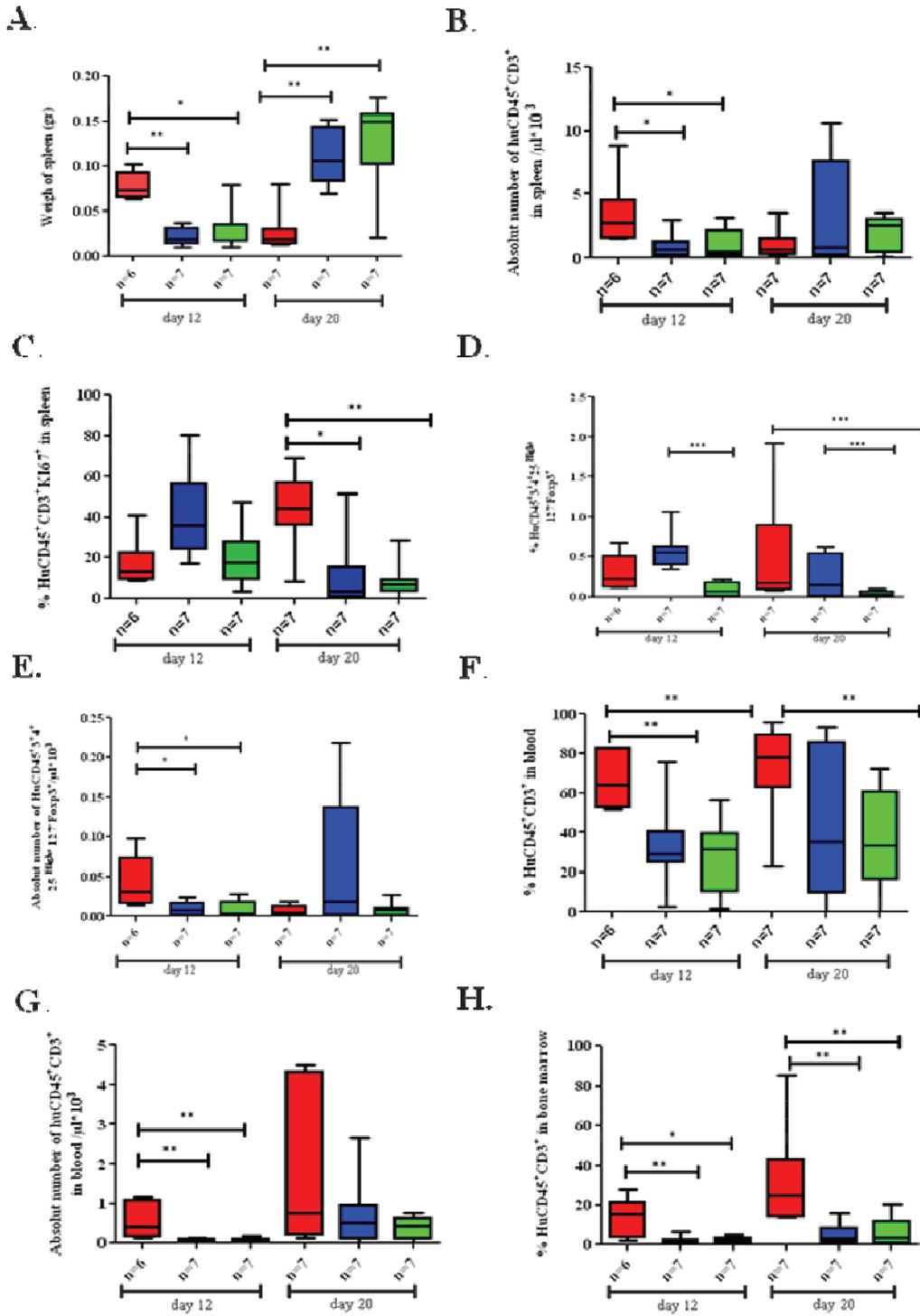


*Figure 4. TCR V $\beta$  repertoire in PBMC before transplantation (red columns) and in spleen cells on day 10 after transplantation in control (green columns) or RAPA mice (blue columns). The number of peaks in each family was comparable among the 3 types of samples.*

### RAPA decreases human chimerism

We then performed further analyses aimed at dissecting potential mechanisms of xGVHD prevention by RAPA. Specifically, control, RAPA, and Treg depletion + RAPA mice were sacrificed on day 12 (n = 21, 7 mice per group) or 20 (n = 21, 7 mice per group) after transplantation. Human chimerism levels were assessed by flow cytometry.

On day 12 after transplantation, spleens were significantly heavier in control than in RAPA ( $P = 0.001$ ) or Treg depletion + RAPA ( $P = 0.01$ ) mice (**Figure 5A**). Further, absolute numbers of human CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$  cells in the spleen were significantly higher in control than in RAPA ( $P = 0.014$ ) or Treg depletion + RAPA ( $P = 0.05$ ) mice, while percentages of human CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ KI67 $^{+}$  cells (T cells in cell cycle) were comparable in the 3 groups (**Figure 5B-C**). Interestingly, percentages of Treg were significantly higher in RAPA than in Treg depletion + RAPA mice ( $P = 0.0006$ ), while absolute numbers of Treg were higher in control than in RAPA ( $P = 0.02$ ) or Treg depletion + RAPA mice ( $P = 0.02$ ) (**Figure 5D-E**). As observed in the spleen, percentages of human CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$  cells were significantly higher in control than in RAPA or Treg depletion + RAPA mice in the blood ( $P = 0.008$  and  $P = 0.008$ , respectively) (**Figure 5F**), and in the bone marrow ( $P = 0.004$  and  $P = 0.002$ , respectively) (**Figure 5H**).

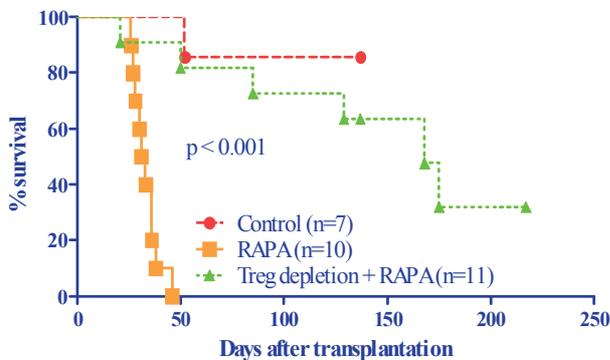


**Figure 5.** Impact of RAPA administration on spleen size and human chimerism on day 12 or 20 after transplantation of  $2 \times 10^6$  human PBMC. **A.** Spleen weight in control (red bars), RAPA (blue bars), and Treg depletion + RAPA (green bars) mice on days 12 or 20 after transplantation. **B-C.** Absolute number of human T cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) and percentage of human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>K167<sup>+</sup> T cells in spleen. **D-E.** Percentage and absolute number of human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T cells. **F-G.** Percentage and absolute number of human T cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) in blood. **H.** Percentage of human T cells (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) in bone marrow.

On day 20 after transplantation, in contrast to what was observed on day 12, spleens were significantly slight in control than in RAPA ( $P = 0.001$ ) or Treg depletion + RAPA ( $P = 0.004$ ) (**Figure 5A**), while absolute numbers of human  $CD45^+CD3^+$  cells in the spleen were similar in the 3 groups. Interestingly, percentages of human  $CD45^+CD3^+KI67^+$  cells (T cells in cell cycle) were higher in control than in RAPA ( $P = 0.01$ ) or Treg depletion + RAPA ( $P = 0.004$ ) mice (**Figure 5B-C**). Percentages of Treg were significantly higher in control and in RAPA mice than in Treg depletion + RAPA mice, while absolute numbers of Treg were comparable in the 3 groups (**Figure 5D-E**). Numbers of human  $CD45^+CD3^+$  cells in the blood were similar in the 3 groups (**Figure 5G**), while percentages of human  $CD45^+CD3^+$  cells in the bone marrow were significantly higher in control than in RAPA ( $P = 0.0023$ ) or Treg depletion + RAPA ( $P = 0.0023$ ) mice (**Figure 5H**).

### RAPA treatment does not induce tolerance

In order to determine whether RAPA treatment induced tolerance, NSG mice irradiated with 2.5 Gy on days -1 received an i.v. infusion of  $2 \times 10^6$  human cells obtained from the spleen from control, RAPA, or Treg depletion + RAPA mice on day 22 after transplantation (secondary transplantation). As shown in **Figure 6**, survival was significantly shorter in mice given cells from RAPA mice than in those given cells from control or Treg depletion + RAPA mice ( $P < 0.001$ ).



**Figure 6.** Survival of NSG mice after i.v. injection of  $2 \times 10^6$  human cells obtained from spleen suspension from control (red rounds,  $n = 7$ ), RAPA (orange squares,  $n = 10$ ), or Treg depletion + RAPA (green triangles,  $n = 11$ ) mice on day 22 (secondary transplantation) ( $P < 0.001$ ). Survival data from 3 independent consecutive experiments are combined.

## DISCUSSION

mTOR inhibitors such as RAPA have generated considerable interest because, unlike other immunosuppressive drugs such as calcineurin inhibitors or steroids, they preferentially inhibit proliferation of conventional T cells, thus promoting outgrowth of Treg that do not depend on the mTOR pathway to proliferate [8, 9, 14-20]. This prompted us to assess the impact of RAPA administration on xenogeneic GVHD prevention in a humanized mouse model. Several observations were made.

First, RAPA administration decreased human T-cell proliferation as well as decreased human chimerism in spleen, blood and bone marrow on day 20 after transplantation. This lower T-cell proliferation was associated with a significant delay in the development of xGVHD and a prolongation of survival. These results are consistent with previous experiments in aGVHD mice models [7, 21, 22]. This is also in agreement with our previous study in NSG mice given  $30 \times 10^6$  PBMC i.p. and mesenchymal stromal cells ( $3$  or  $12 \times 10^6$ ) where we observed that administration of RAPA was associated with a prolongation of survival and a decrease in IL-2, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  blood levels [11].

However, tolerance was not induced by RAPA in the current study, given that RAPA mice that survived acute xGVHD eventually developed signs of sclerodermic chronic GVHD. This result seems comparable to what we have recently observed with Treg administration alone. Indeed, we have demonstrated in our xenogeneic mouse model that although survival time of mice receiving co-injection of human Treg with PBMC (ratio 1:2) was significantly increased, some mice developed also signs of sclerodermic chronic GVHD [23]. This result could be explained by an expansion of effectors T-cells by loss of peripheral tolerance when the RAPA treatment is stopped or, in the case of Hannon *et al.* studies by the fact that the dose of Treg injected might have been suboptimal. So, it would be interesting to combine injection of low-dose of IL-2 with RAPA treatment and/or with injection of Treg to see if it would completely inhibit the development of xenogeneic GVHD.

Secondly, we observed that the reduction of T-cell proliferation by RAPA was homogeneous, as the numbers of peaks in each TCR V $\beta$  family was comparable between PBMC before injection and spleen cells from the RAPA and control groups 10 days after transplantation in NSG mice.

Third, the beneficial impact of RAPA administration was markedly reduced when CD25-depleted PBMC were used instead of unmanipulated PBMC, suggesting that the beneficial effect of RAPA was at least partly mediated by Treg, as observed in previous experiment in aGVHD mice model by Zeiser *et al.* [24]. However, unlike observed by Zeiser *et al.* we did not observe any increase in Treg absolute number or frequency in groups treated with RAPA. One explanation is that we used human PBMC to induce aGVHD in mice, whereas Zeiser *et al.* used mice cells. Another possible explanation is that RAPA administration decreases human serum IL-2 in the NSG xGVHD model [11], while Treg strongly depend on IL-2 to survive and proliferate [22, 25-31]. So additional studies should assess whether the association of RAPA with IL-2 would be successful to further promote Treg over conventional T-cells expansion and better prevent xGVHD in our model, as observed in a classical murine model of acute GVHD [9].

Finally, we have investigated whether RAPA induced human T-cell tolerance after secondary transplantation and demonstrated that survival was instead significantly longer in mice given cells from control or Treg depletion + RAPA donor mice, suggesting that inhibition of mTOR in human conventional T cells was reversed in the absence of RAPA. These results can be explained by the fact that effectors T-cells even if they were in the presence of RAPA for 21 days in a primary host, in the absence of RAPA, they can proliferate and perform their effectors activity in a secondary host.

In conclusion, our data suggest that RAPA administration delayed the occurrence of xGVHD by reducing human conventional T-cell proliferation and probably by maintaining Treg function. Further studies are needed to investigate whether administration of RAPA plus IL-2 could promote expansion of Treg and iTreg differentiation and so could induce permanent tolerance in our xGVHD mice model. Additional analysis are necessary to explore RAPA impacts on serum level of cytokines require to development of some types of iTreg, such as TGF- $\beta$  [32, 33] or IL-10 [34] and in signaling pathways involvement in the generation of iTreg in our xGVHD mice model.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by funds from the National Fund for Scientific Research (FNRS), the fund Leon Fredericq and Anti-Cancer Center at the University of Liège and the Belgian Federation Against Cancer. FBr, LB and MH are Télévie Research Assistants, SHB is postdoctoral researcher and FBa is senior research associate of the National Fund for Scientific Research (FNRS) Belgium. We are very grateful to Pierre Drion for his help with the mouse experiments and to Sandra Ormenese from the Imaging and Flow Cytometry Platform of the GIGA for help with flow cytometry analyses. We are also grateful to Olivier Dengis, Amélie Halleux and Coline Daulne for excellent technical assistance.

## **REFERENCES**

1. Baron, F., et al., Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia*, 2012. 26(12): p. 2462-8.
2. Storb, R., J.H. Antin, and C. Cutler, Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010. 16(1 Suppl): p. S18-27.
3. Chi, H., Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(5): p. 325-38.
4. Strauss, L., et al., Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS ONE*, 2009. 4(6): p. e5994.
5. Strauss, L., et al., Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J Immunol*, 2007. 178(1): p. 320-9.

## -Section expérimentale: Partie II-

---

6. Battaglia, M., et al., Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol*, 2006. 177(12): p. 8338-47.
7. Palmer, J.M., et al., Novel mechanism of rapamycin in GVHD: increase in interstitial regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant*, 2010. 45(2): p. 379-84.
8. Zeiser, R., et al., Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*, 2006. 108(1): p. 390-9.
9. Shin, H.J., et al., Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood*, 2011. 118(8): p. 2342-50.
10. Hogan, W.J., et al., Postgrafting immunosuppression with sirolimus and cyclosporine facilitates stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given sublethal total body irradiation before marrow transplantation from DLA-identical littermates. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003. 9(8): p. 489-95.
11. Bruck, F., et al., Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*, 2013. 15(3): p. 267-79.
12. Ali, N., et al., Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R $\gamma$ manu null mice display a T-effector memory phenotype. *PLoS ONE*, 2012. 7(8): p. e44219.
13. Cooke, K.R., et al., Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 2000. 70(2): p. 272-9.
14. Segundo, D.S., et al., Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*, 2006. 82(4): p. 550-7.
15. Coenen, J.J., et al., Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood*, 2006. 107(3): p. 1018-23.
16. Kopf, H., et al., Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol*, 2007. 7(13): p. 1819-24.
17. Valmori, D., et al., Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J Immunol*, 2006. 177(2): p. 944-9.
18. Basu, S., et al., Cutting edge: Foxp3-mediated induction of p12 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol*, 2008. 180(9): p. 5794-8.
19. Procaccini, C. and G. Matarese, Regulatory T cells, mTOR kinase, and metabolic activity. *Cell Mol Life Sci*, 2012.
20. Powell, J.D., et al., Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*, 2012. 30: p. 39-68.
21. Chen, B.J., R.E. Morris, and N.J. Chao, Graft-versus-host disease prevention by rapamycin: cellular mechanisms. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2000. 6(5A): p. 529-36.
22. Zeiser, R. and R.S. Negrin, Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle*, 2008. 7(4): p. 458-62.
23. Hannon, M., et al., Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Transfusion*, 2013.
24. Zeiser, R., et al., Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood*, 2008. 111(1): p. 453-62.
25. Zorn, E., et al., IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*, 2006. 108(5): p. 1571-9.
26. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol*, 2008. 29(9): p. 429-35.
27. Thornton, A.M., et al., Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*, 2004. 172(11): p. 6519-23.

## -Section expérimentale: Partie II-

---

28. Malek, T.R. and A.L. Bayer, Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(9): p. 665-74.
29. Nelson, B.H., IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*, 2004. 172(7): p. 3983-8.
30. Nelson, E.A., et al., Identification of human STAT5-dependent gene regulatory elements based on interspecies homology. *J Biol Chem*, 2006. 281(36): p. 26216-24.
31. Battaglia, A., et al., Interleukin-21 (IL-21) synergizes with IL-2 to enhance T-cell receptor-induced human T-cell proliferation and counteracts IL-2/transforming growth factor-beta-induced regulatory T-cell development. *Immunology*, 2013. 139(1): p. 109-20.
32. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 2009. 30(5): p. 626-35.
33. Sawamukai, N., et al., Cell-autonomous role of TGFbeta and IL-2 receptors in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T-cell generation during GVHD. *Blood*, 2012. 119(23): p. 5575-83.
34. Levings, M.K., et al., IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol*, 2001. 166(9): p. 5530-9.

# **Discussion et perspectives**

Dans la **première partie** de ce travail, nous avons donc observé que l'administration i.p. de CSM dérivées de moelles osseuses humaines ne prévenait pas l'apparition de GVHDA dans deux modèles murins xénogéniques.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle de GVHDA xénogénique chez la souris NOD/SCID en injectant en i.p. des PBMC humaines. Nous avons choisi d'injecter les PBMC en i.p. car les premiers travaux décrivant la mise au point de modèles de GVHDA xénogénique chez la souris SCID (Hoffmann-Fezer, Gall et al. 1993; Sandhu, Gorczynski et al. 1995) montraient que cette voie d'administration permettait d'obtenir de hauts niveaux d'infiltration de cellules humaines dans la rate, le foie et les poumons lors de l'injection de PBMC humaines un jour après irradiation sublétales et traitement par anti-NK. Ces souris présentaient les symptômes caractéristiques de la GVHDA tels que: une perte de poids > 10%, de la tachypnée, de l'anémie, un dos voûté, et un poil hirsute (Cooke, Hill et al. 2000).

Plus tard, Gorin et *al.* ont défini une atteinte de GVHDA lorsque les souris présentaient une infiltration en lymphocytes T humains de plus de 10% dans la moelle osseuse (Gorin, Piantadosi et al. 2002). Afin d'obtenir ce niveau d'infiltration, nous avons dû augmenter la dose de PBMC à injecter par rapport à ce qui avait été décrit précédemment par Sandhu et *al.* Ainsi, en injectant en i.p.  $2 \times 10^8$  hPBMC à des souris NOD/SCID un jour après leur irradiation à 3 Gy et traitement par anti-NK, 100% des animaux présentaient les symptômes caractéristiques de la GVHDA et mouraient dans les 30 jours après greffe. Lors de l'analyse nécroscopique, toutes les souris présentaient un taux d'infiltration en lymphocytes T > 10% dans la moelle osseuse.

L'émergence de souris immunodéficientes présentant des mutations du gène codant la chaîne  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2, telles que les souris NSG, a permis de lever les limitations rencontrées dans notre modèle de GVHDA xénogénique chez la souris NOD/SCID. Chez les souris NSG, nous avons mis au point deux modèles de GVHDA xénogénique, l'un en injectant des hPBMC en i.p. et l'autre en i.v. En injectant en i.p. des doses 10 fois moindres et en i.v. 100 fois moindres que chez la souris NOD/SCID, sans traitement préalable par anti-NK et en diminuant la dose d'irradiation à 2.5 Gy, nous avons pu obtenir chez la souris NSG des niveaux d'infiltration en lymphocytes T humains dans la rate, la moelle osseuse, le sang, le foie et les poumons équivalents voire supérieurs. Ici également, les souris mouraient généralement de GVHDA dans les 30 jours après greffe.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la capacité des CSM à prévenir la GVHDA dans notre modèle chez la souris NOD/SCID. Tout d'abord, nous avons analysé la migration des CSM injectées en i.p. chez des souris NOD/SCID saines afin de voir si elles pouvaient migrer dans les organes cibles de la GVHDA xénogénique. Nous avons choisi d'injecter les CSM en i.p. pour éviter les phénomènes

d'embolie pulmonaire. Cette voie d'administration des CSM a par ailleurs été démontrée efficace dans un modèle murin de GVHDa (Christensen, Turner et al. 2010). Par PCR quantitative, nous avons pu observer que les CSM migraient dans les différents organes analysés (reins, rate, foie, moelle osseuse, intestin et poumons) mais se localisaient préférentiellement dans la moelle osseuse. Par contre, nous n'avons observé aucune différence entre les souris contrôles et les souris recevant des CSM, ni concernant les symptômes de la GVHDa ni au point de vue de l'infiltration par les cellules humaines. L'absence d'effet bénéfique lors de l'injection de CSM dans ce modèle était peut-être liée à une faible dose de CSM injectée par rapport aux PBMC (rapport 1:100). Bien que, ce rapport entre doses de PBMC et de CSM est proche de ce qui se pratique dans les études cliniques de prévention de la GVHD, des travaux récents rapportent que dans un rapport CSM:PBMC faible (1:40), *in vitro*, les CSM favorisent la prolifération des lymphocytes T (Najar, Rouas et al. 2009). Suite à ces résultats, nous avons donc décidé d'augmenter la dose de CSM à injecter.

En raison de la faible disponibilité en CSM humaines, il nous était difficile d'augmenter le nombre de CSM à injecter dans le modèle NOD/SCID. Nous avons donc poursuivi nos recherches dans nos modèles (i.v. et i.p.) de GVHDa xénogénique chez la souris NSG. En effet, par le fait que nous pouvions induire une GVHDa chez la souris NSG en injectant en i.p. des doses de PBMC presque 10 fois plus faibles que chez la souris NOD/SCID, nous avons pu plus facilement augmenter le rapport CSM:PBMC. En se basant sur des travaux menés précédemment par Tisato et *al.* qui observaient qu'il fallait des injections répétées de CSM pour prévenir le développement de la GVHDa (Tisato, Naresh et al. 2007), nous avons réalisé des injections i.p. répétées de CSM de moelle osseuse de façon à obtenir comme Tisato et *al.* un rapport final CSM:PBMC égal à 1:12. Bien qu'une seule souris ait survécu jusqu'au jour 136 après greffe (mais présentait 60 jours après greffe des signes de GVHDc), nous n'avons observé aucune amélioration significative ni sur l'incidence de la GVHDa ni sur le taux d'infiltration par des cellules humaines. Cette différence de résultats par rapport à ce qui a été observé par Tisato et *al.* est peut-être liée à l'origine des CSM injectées (CSM de sang de cordon ombilical *vs.* CSM de moelle osseuse) et/ou au mode d'injection des CSM (i.v. *vs.* i.p.). Dû à la difficulté d'obtention de CSM à partir de sang de cordon ombilical (Wexler, Donaldson et al. 2003; Bieback, Kern et al. 2004; Kern, Eichler et al. 2006; Vasaghi, Dehghani et al. 2013), nous avons continué à travailler avec des CSM dérivées de moelle osseuse que nous avons injecté en i.v. à la même doses que lors des injections i.p. Cependant, certaines souris mouraient d'embolie pulmonaire.

Face à l'absence d'effet bénéfique lors d'injections répétées de CSM dans notre modèle de GVHDa xénogénique chez la souris NSG, nous nous sommes posé plusieurs questions: tout d'abord, est-ce que les CSM se trouvent dans un environnement favorable pour exercer leur activité immunosuppressive? En effet, il a été démontré que les CSM nécessitent la présence de certaines cytokines pro-

inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , et IL-1 $\beta$ ) afin d'exercer leur activité immunosuppressive. Plusieurs travaux ont démontré que l'IFN- $\gamma$  jouait un rôle majeur dans l'initiation de cette activité. En effet, Sheng et *al.* ont observé que l'IFN- $\gamma$  stimulait l'activité immunomodulatrice des CSM en augmentant l'expression de la molécule inhibitrice B7-H1 (également connue sous le nom de PD-L1). La liaison du B7-H1 exprimé à la surface des CSM à son récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T engendre un signal inhibiteur empêchant la prolifération de ces derniers (Sheng, Wang et al. 2008). L'IFN- $\gamma$  induit également la production par les CSM d'IDO ainsi que celle de TGF- $\beta$ , COX-2 et de la PGE2 (English, Barry et al. 2007; Ryan, Barry et al. 2007) qui sont impliqués dans l'activité suppressive des CSM. De plus, il a été observé que les CSM provenant de souris déficientes pour le gène codant le récepteur à l'IFN- $\gamma$  étaient incapables de prévenir la GVHDA (Aggarwal and Pittenger 2005; Polchert, Sobinsky et al. 2008; Ren, Zhang et al. 2008). Polchert et *al.* ont également démontré que des CSM de souris préalablement stimulées avec de haute dose d'IFN- $\gamma$  diminuaient l'incidence de GVHDA par comparaison à des CSM non traitées (Polchert, Sobinsky et al. 2008).

Nous avons donc stimulé les CSM dérivées de moelle osseuse 24 heures avant injection i.p., mais, contrairement à ce qui a été observé par Polchert et *al.*, nous n'avons observé aucune différence au niveau de l'incidence de GVHD entre les souris contrôles et les souris ayant reçu des CSM traitées ou non avec de l'IFN- $\gamma$ . Cette différence de résultats pourrait encore s'expliquer par le fait que nous avons utilisé des CSM humaines et Polchert et *al.* des CSM murines. Les CSM murines et humaines ont des caractéristiques distinctes qui expliquent qu'elles ne répondent pas de la même manière aux stimulations externes (Miura, Miura et al. 2006; Sudres, Norol et al. 2006; Meisel, Brockers et al. 2011). De plus, nous avons observé *in vitro* que les CSM traitées avec de l'IFN- $\gamma$  avaient une morphologie différente des CSM non traitées. En effet, elles présentaient une forme irrégulière et une prolifération moins rapide que les CSM non traitées ce qui rejoint les observations de Romieu-Mourez et *al.* et Prasanna et *al.* (Romieu-Mourez, Francois et al. 2009; Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010).

Par contre, Tobin et *al.* ont observé récemment que les CSM de moelle osseuse stimulées ou non avec de l'IFN- $\gamma$  avant injection i.v. dans un modèle de GVHDA xénogénique chez la souris NSG, augmentaient significativement la durée de vie des souris après greffe. Cette différence de résultats avec nous pourrait encore s'expliquer par le fait que le mode d'administration et la dose diffèrent des nôtres. En effet, tout d'abord ils ont induit la GVHDA en injectant en i.v. des PBMC humaines ( $6.3 \times 10^5$ /gr de souris) ainsi que les CSM ( $4.4 \times 10^4$ /gr de souris, au jour 7 pour les CSM non traitées et au jour 0 pour les CSM traitées par l'IFN- $\gamma$  48 heures avant injection). Cependant, bien qu'ils observent une augmentation significative de la survie des souris, il n'y avait pas de diminution de l'implantation des cellules CD45<sup>+</sup> humaines dans le foie, les poumons et la rate, au jour 8 ou 12 après greffe. Il n'y

avait pas non plus de modification du rapport CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> ni du taux sérique d'IL-2. Tout cela suggère que les CSM n'entravent pas l'implantation des lymphocytes T effecteurs *in vivo*.

Concernant le mécanisme d'action des CSM dans leur modèle xénogénique de GVHDA, Tobin et *al.* ont démontré qu'elles n'induisaient ni l'apoptose ni l'anergie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains. Par contre, les CSM diminuaient la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et provoquaient une diminution du taux sérique de TNF- $\alpha$ , principale molécule effectrice des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

De plus, comme nous, ces auteurs n'ont pas observé d'augmentation de la fréquence de lymphocytes Treg humains dans la rate, les poumons et le foie au jour 12. Cela peut s'expliquer par une absence chez la souris de facteurs de croissance favorisant l'expansion des lymphocytes Treg humains et la conversion de lymphocytes T conventionnels en Treg. Cette absence d'expansion et conversion pourrait également expliquer le fait que le traitement par CSM, bien qu'augmentant significativement le temps de survie des souris, ne prévient pas le développement de la GVHDA (Tobin, Healy et al. 2013).

Plusieurs travaux ont donc démontré que la migration, la différenciation, la production et la sécrétion de cytokines et chémokines ainsi que l'activité immunosuppressive des CSM sont fortement influencées par la composition du milieu environnant. Ces modifications sont en partie liées aux messages transmis après stimulation de leur TLRs (Romieu-Mourez, Francois et al. 2009; Prasanna, Gopalakrishnan et al. 2010; Raicevic, Rouas et al. 2010). En effet, les CSM de moelle osseuses expriment différents TLRs (TLR-1, -2, -3, -4, -5, et -6) mais expriment constitutivement de façon importante le TLR-3 et -4, ce qui les rend plus sensibles à une stimulation au poly (I:C) et au LPS, respectivement (Liotta, Angeli et al. 2008). Il a également été démontré que la stimulation de ces TLRs pouvait augmenter la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les CSM de moelle osseuse. Nous avons donc analysé le taux de certaines cytokines dans le sérum des souris traitées ou non par CSM stimulées ou non avec de l'IFN- $\gamma$ . Nous avons démontré que les souris traitées par CSM présentaient une augmentation significative du niveau sérique de l'IL-6 et une augmentation de l'IL-8 par rapport aux souris non traitées. Comme observé *in vitro* par Romieu-Mourez et *al.*, l'augmentation d'IL-6 était encore plus importante dans le sérum des souris qui avaient reçu des CSM pré-traitées par IFN- $\gamma$  (Romieu-Mourez, Francois et al. 2009). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de CSM déficientes pour le gène codant l'IL-6 sur le développement de la GVHDA dans un modèle xénogénique et également voir si cela augmente la fréquence des lymphocytes Treg. En effet, Guichelaar et *al.* ont observé, dans un modèle xénogénique de myélome multiple chez la souris Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma_C$ <sup>-/-</sup>, que l'injection autologue de lymphocytes Treg n'avait aucun impact sur la croissance tumorale dans la moelle osseuse mais bien en dehors de la moelle osseuse. Ces auteurs ont montré que la composition du stroma médullaire inhibait l'activité immunosuppressive des Treg via la

production IL-6/IL-1 $\beta$  et en favorisant la conversion des lymphocytes Treg en lymphocytes produisant de l'IL-17 (Guichelaar, Emmelot et al. 2013).

Bien que le rôle des TLRs dans l'activité immunosuppressive des CSM ne soit pas clair, l'augmentation de l'IL-6 et d'IL-8 pourrait s'expliquer par une augmentation de la réponse du TLR-4 au LPS libéré par le tube digestif endommagé par le régime de conditionnement pré-greffe. En effet, Waterman et al. ont observé une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et IL-8 par les CSM de moelle osseuse après stimulation de leur TLR-4 dont l'expression était augmentée dans un microenvironnement pro-inflammatoire (Waterman, Tomchuck et al. 2010). De plus, ils ont montré que la stimulation du TLR-4 augmentait la production et la sécrétion de collagène par les CSM, ce qui pourrait expliquer la présence de dépôts de collagène dans la peau, le foie et les poumons de la souris traitée par des doses répétées de CSM qui a survécu jusqu'au jour 136 après greffe des PBMC.

Afin de mieux se rendre compte de l'impact de la stimulation des TLRs et plus particulièrement du TLR-4 sur l'activité immunosuppressive des CSM de moelle osseuse, on pourrait étudier l'effet de l'injection de CSM déficientes pour le gène codant le TLR-4 ou des antagonistes de ce dernier. Il serait également intéressant d'utiliser dans notre modèle xénogénique de GVHDA des CSM dérivées d'une autre origine, par exemple de la gelée de Wharton du cordon ombilical. En effet, il a été démontré que les CSM de la gelée de Wharton, qui présentent, comme les CSM de moelle osseuse, la capacité à adhérer au plastique, une morphologie de fibroblastes, un phénotype caractéristique et une activité immunorégulatrice, n'expriment pas le TLR-4. Les CSM de la gelée de Wharton du cordon ombilical sont donc insensibles à une stimulation par le LPS et, par conséquent, moins sensibles à un environnement pro-inflammatoire (Raicevic, Najar et al. 2011).

Nous nous sommes également posé la question de savoir si notre modèle de GVHDA n'était pas trop agressif que pour être contrecarré par une immunothérapie cellulaire ou médicamenteuse. Dans des études menées en parallèle, nous avons démontré dans notre modèle (i.v. et i.p.) de GVHDA xénogénique chez la souris NSG que l'administration de RAPA (sirolimus) prévenait la GVHDA et augmentait significativement la survie des souris. Nous avons donc co-administré des CSM et de la RAPA chez des souris NSG et avons observé une augmentation significative de survie semblable à celle obtenue avec la RAPA seule. Cette amélioration de survie était corrélée avec une diminution significative de l'IL-2, -8, -10, du TNF- $\alpha$ , et de l'IFN- $\gamma$  par rapport aux souris contrôles et aux souris ayant reçu des CSM seules traitées ou non par IFN- $\gamma$ . Par contre, le taux d'IL-6 était significativement plus élevé chez les souris ayant reçu des CSM et de la RAPA par comparaison aux souris contrôles.

En conclusion, dans cette première partie du travail, nous avons observé que l'injection de CSM de moelle osseuse ne prévenait pas la GVHDA dans notre modèle xénogénique et que cette absence

d'effet bénéfique était liée notamment à une augmentation importante du taux de sécrétion d'IL-6 par les CSM.

Dans la **deuxième partie** du travail, nous avons démontré que l'administration de RAPA pendant 21 jours retardait le développement de la GVHD xénogénique et que cet effet bénéfique était partiellement aboli par la déplétion en Treg du greffon.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'administration de RAPA chez des souris NSG irradiées à 2.5 Gy un jour avant la greffe i.v. de  $2 \times 10^6$  PBMC humaines diminuait significativement l'incidence de GVHDa xénogénique. Cette diminution était accompagnée d'une diminution significative du niveau d'infiltration par les lymphocytes T humains dans la rate, la moelle osseuse et le sang au jour 12 et 20 après greffe.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact de la déplétion du greffon en lymphocytes Treg sur le développement de la GVHDa. Il a été largement démontré *in vitro* que la RAPA favorise l'expansion des Treg (Battaglia, Stabilini et al. 2005; Strauss, Whiteside et al. 2007; Basu, Golovina et al. 2008). *In vivo*, divers modèles de greffe d'organe solide et de maladies auto-immunes ont montré que la RAPA induisait une tolérance en favorisant l'expansion des Treg (Battaglia, Stabilini et al. 2006; Coenen, Koenen et al. 2007). De plus, Zeiser et al. ont montré dans un modèle murin de GVHDa que la RAPA bloquait la prolifération et l'expansion des lymphocytes T effecteurs mais pas des Treg (Zeiser, Leveson-Gower et al. 2008).

Dans notre modèle xénogénique de GVHDa chez des souris traitées à la RAPA durant 21 jours, nous avons démontré que les souris ayant reçu des PBMC humaines déplétées en Treg présentaient une survie réduite de plus de moitié par rapport aux souris ayant reçu des PBMC totales et non traitées à la RAPA.

Ensuite, nous avons analysé le pourcentage et le nombre absolu de Treg humains ( $CD45^+CD4^+CD25^{+High}CD127^-Foxp3^+$ ) au jour 12 et 20 dans la rate des souris du groupe RAPA, du groupe PBMC déplétées en Treg + RAPA, et du groupe PBMC. Contrairement à ce qui a été observé précédemment dans un modèle murin de GVHDa par Zeiser et al., nous n'avons pas observé d'augmentation ni de la fréquence ni du nombre absolu de Treg lors de l'administration de RAPA dans notre modèle de xénogénique de GVHDa par comparaison aux souris non traitées. Ce qui peut s'expliquer par le fait que les Treg ne se trouvent pas dans un milieu favorisant leur expansion. En effet, nous avons observé dans la première partie de ce travail que le taux sérique d'IL-2 qui est essentielle au maintien et à l'expansion des Treg *in vivo* (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006; Zorn, Nelson et al. 2006), était significativement diminué chez les souris NSG traitées à la RAPA, alors que Shin et al. ont démontré dans un modèle murin de GVHDa que la combinaison de RAPA plus IL-2 favorisait de façon plus importante l'expansion des Treg présents dans le greffon ainsi que la

conversion des lymphocytes T conventionnels en Treg par rapport à l'administration de RAPA ou d'IL-2 seule (Shin, Baker et al. 2011).

Récemment, Abraham *et al.* ont observé que l'injection hydrodynamique d'un plasmide exprimant l'IL-2 chez la souris NOD/SCID $\gamma_C^{-/-}$  augmentait la survie et l'expansion des Treg humains sans perte de leur activité immunosuppressive (Abraham, Pahwa et al. 2012). Plus récemment, notre équipe a démontré dans un modèle xénogénique de GVHDA chez la souris NSG que la co-infusion de Treg avec des PBMC dans un rapport 1:2 prolongeait significativement la survie des souris par rapport aux souris qui n'avaient pas reçu de Treg. Cependant, bien que leur survie fût augmentée les souris qui survivaient au-delà du jour 75 après co-infusion de PBMC et Treg développaient des signes de GVHDc (Hannon, Lechanteur et al. 2013). Nous avons également observé cela chez les 10 souris sur 28 traitées par RAPA et ayant survécu au-delà du jour 60. Ce phénomène peut-être dû à une expansion des lymphocytes T effecteurs par perte de la tolérance périphérique lorsque le traitement à la RAPA est arrêté ou, dans le cas de l'étude de Hannon *et al.*, au fait que la dose de Treg n'était peut-être pas suffisante. Il serait donc intéressant, dans notre modèle de GVHDA xénogénique, de combiner l'injection de faibles doses d'IL-2 avec le traitement par RAPA et/ou avec l'injection de Treg afin de voir si cela permettrait d'inhiber complètement le développement de la GVHD xénogénique.

Dans un troisième temps, nous avons démontré que la RAPA n'induisait pas de tolérance lors de transplantation secondaire. En effet, nous avons observé que des souris greffées avec des cellules de rate provenant de souris NSG du groupe PBMC totales ou du groupe PBMC déplétées en CD25<sup>+</sup> + RAPA, avaient une durée de vie significativement plus longue par rapport aux souris ayant reçu des cellules de rate de souris NSG du groupe PBMC + RAPA. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les lymphocytes T effecteurs même si ils ont été mis en présence de RAPA durant 21 jours dans un hôte primaire, dans un hôte secondaire en absence de RAPA, ils peuvent proliférer et exercer leur activité effectrice. Il sera donc important de comparer quelques jours après la greffe secondaire, le taux d'activation et de prolifération de lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes Treg dans les trois groupes de souris.

En conclusion, nos données suggèrent que l'administration de RAPA retarde/prévient l'apparition de la GVHDA dans notre modèle xénogénique en réduisant la prolifération des lymphocytes T effecteurs et probablement en maintenant l'activité suppressive des Treg présents dans le greffon.

Cependant, ces données nécessitent des analyses complémentaires telles que, la mesure dans le sérum des souris de certaines cytokines pouvant influencer l'expansion et le maintien de l'activité suppressive des Treg et/ou la conversion de lymphocytes T effecteurs en Treg, comme par exemple l'IL-10 (Tawara, Sun et al. 2012) et le TGF- $\beta$  (Sawamukai, Satake et al. 2012).

Ces études devront être complétées par l'analyse des mécanismes moléculaires par lesquels la RAPA agit sur les Treg, par exemple en mesurant le taux d'expression de Pim 2 par les Treg (Basu, Golovina et al. 2008; Powell, Pollizzi et al. 2012).

Nous pourrions aussi analyser l'impact de l'administration de la RAPA sur la proportion d'autres populations cellulaires à activité immunosuppressive, telles que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Récemment, Robb et *al.* ont montré dans un modèle murin de greffe allogénique de moelle osseuse que la co-administration de RAPA avec le complexe IL-2/IL-2 mAb (anticorps monoclonaux) (Kamimura and Bevan 2007) après greffe (au jour 0 et au jour 4) augmentait significativement le pourcentage de CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> tout en maintenant leur activité immunosuppressive (Robb, Lineburg et al. 2012).

Dans notre modèle xénogénique de GVHDa, on pourrait également étudier l'effet de l'administration d'agents autres que la RAPA, tel que notamment la formulation liposomale d' $\alpha$ -galactosylceramide (RGI-2001). En effet, Duramad et *al.* ont démontré dans un modèle murin de GVHDa que l'administration i.v. de RGI-2001 au moment de la greffe allogénique de moelle osseuse prolongeait la survie des souris. De plus, le RGI-2001 induisait une augmentation de la fréquence et du nombre absolu des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> dans la rate. Ils ont également observé un effet synergique de la RAPA et du RGI-2001 sur la survie des souris (Duramad, Laysang et al. 2011).

L'azacitidine (Aza), est un autre agent qui pourrait être testé dans notre modèle. L'Aza est un analogue de la pyridine agissant principalement par l'hypométhylation des résidus cytosine et qui est de plus en plus utilisé dans le cadre du traitement de syndromes myélodysplasiques ou de LMA. Différents travaux dans des modèles murins de greffes allogéniques de CSH ont récemment démontré que l'administration d'Aza prévenait le développement de la GVHD tout en maintenant l'effet GVL. Cet effet était attribué en partie à une augmentation de l'expression du Foxp3<sup>+</sup> (Choi, Ritchey et al. 2010; Sanchez-Abarca, Gutierrez-Cosio et al. 2010).

# Références

- Abhyankar, S., D. G. Gilliland, et al. (1993). "Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens." *Transplantation* **56**(6): 1518-1523.
- Abraham, S., R. Pahwa, et al. (2012). "Long-term engraftment of human natural T regulatory cells in NOD/SCID IL2rgammac(null) mice by expression of human IL-2." *PLoS ONE* **7**(12): e51832.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* **105**(4): 1815-1822.
- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg (2006). "IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients." *Blood* **107**(6): 2409-2414.
- Ali, N., B. Flutter, et al. (2012). "Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2Rgammanull mice display a T-effector memory phenotype." *PLoS ONE* **7**(8): e44219.
- Almeida-Porada, G., J. L. Ascensao, et al. (1996). "The role of sheep stroma in human haemopoiesis in the human/sheep chimaeras." *Br J Haematol* **93**(4): 795-802.
- Almeida-Porada, G., R. L. Brown, et al. (2000). "Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model." *J Hematother Stem Cell Res* **9**(5): 683-693.
- Alousi, A. M., D. J. Weisdorf, et al. (2009). "Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network." *Blood* **114**(3): 511-517.
- Anklesaria, P., M. A. Sakakeeny, et al. (1987). "Expression of a selectable gene transferred by a retroviral vector to hematopoietic stem cells and stromal cells in murine continuous bone marrow cultures." *Exp Hematol* **15**(2): 195-202.
- Antin, J. H., H. T. Kim, et al. (2003). "Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation." *Blood* **102**(5): 1601-1605.
- Antin, J. H., D. Weisdorf, et al. (2002). "Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **100**(10): 3479-3482.
- Anzalone, R., M. Lo Iacono, et al. (2010). "New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity." *Stem Cells Dev* **19**(4): 423-438.
- Arai, S., J. Margolis, et al. (2002). "Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment." *Biol Blood Marrow Transplant* **8**(3): 155-160.
- Arai, S., B. Sahaf, et al. (2012). "Prophylactic rituximab after allogeneic transplantation decreases B-cell alloimmunity with low chronic GVHD incidence." *Blood* **119**(25): 6145-6154.
- Badillo, A. T., W. H. Peranteau, et al. (2008). "Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease." *Br J Haematol* **141**(2): 224-234.
- Ball, L. M., M. E. Bernardo, et al. (2007). "Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation." *Blood* **110**(7): 2764-2767.
- Banovic, T., K. P. MacDonald, et al. (2005). "TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe?" *Blood* **106**(6): 2206-2214.
- Baron, F., M. Labopin, et al. (2012). "Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation." *Leukemia* **26**(12): 2462-2468.
- Baron, F., C. Lechanteur, et al. (2010). "Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning." *Biol Blood Marrow Transplant* **16**(6): 838-847.
- Baron, F., M. B. Maris, et al. (2005). "Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning." *J Clin Oncol* **23**(9): 1993-2003.

- Baron, F. and R. Storb (2006). "Allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning as treatment for hematologic malignancies and inherited blood disorders." *Mol Ther* **13**(1): 26-41.
- Baron, F. and R. Storb (2012). "Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease?" *Biol Blood Marrow Transplant* **18**(6): 822-840.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo." *Exp Hematol* **30**(1): 42-48.
- Basu, S., T. Golovina, et al. (2008). "Cutting edge: Foxp3-mediated induction of p120 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin." *J Immunol* **180**(9): 5794-5798.
- Battaglia, A., A. Buzzonetti, et al. (2013). "Interleukin-21 (IL-21) synergizes with IL-2 to enhance T-cell receptor-induced human T-cell proliferation and counteracts IL-2/transforming growth factor-beta-induced regulatory T-cell development." *Immunology* **139**(1): 109-120.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2006). "Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells." *Diabetes* **55**(6): 1571-1580.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2006). "Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients." *J Immunol* **177**(12): 8338-8347.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2005). "Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." *Blood* **105**(12): 4743-4748.
- Bayer, A. L., A. Yu, et al. (2005). "Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period." *J Exp Med* **201**(5): 769-777.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-21.
- Bensidhoum, M., A. Chapel, et al. (2004). "Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment." *Blood* **103**(9): 3313-3319.
- Bernardo, M. E., L. M. Ball, et al. (2011). "Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation." *Bone Marrow Transplant* **46**(2): 200-207.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bieback, K., S. Kern, et al. (2004). "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Stem Cells* **22**(4): 625-634.
- Billerbeck, E., W. T. Barry, et al. (2011). "Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Rgamma(null) humanized mice." *Blood* **117**(11): 3076-3086.
- Billingham, R. E. (1966). "The biology of graft-versus-host reactions." *Harvey Lect* **62**: 21-78.
- Blache, C., J. M. Chauvin, et al. (2010). "Reduced frequency of regulatory T cells in peripheral blood stem cell compared to bone marrow transplantations." *Biol Blood Marrow Transplant* **16**(3): 430-434.
- Blazar, B. R., B. M. Carreno, et al. (2003). "Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism." *J Immunol* **171**(3): 1272-1277.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, et al. (1997). "CD28/B7 interactions are required for sustaining the graft-versus-leukemia effect of delayed post-bone marrow transplantation splenocyte infusion in murine recipients of myeloid or lymphoid leukemia cells." *J Immunol* **159**(7): 3460-3473.
- Bleakley, M. and S. R. Riddell (2004). "Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect." *Nat Rev Cancer* **4**(5): 371-380.
- Bolanos-Meade, J. and G. B. Vogelsang (2008). "Chronic graft-versus-host disease." *Curr Pharm Des* **14**(20): 1974-1986.
- Brehm, M. A., A. Cuthbert, et al. (2010). "Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three

- immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation." Clin Immunol **135**(1): 84-98.
- Briquet, A., S. Dubois, et al. (2010). "Prolonged ex vivo culture of human bone marrow mesenchymal stem cells influences their supportive activity toward NOD/SCID-repopulating cells and committed progenitor cells of B lymphoid and myeloid lineages." Haematologica **95**(1): 47-56.
- Brok, H. P., J. M. Vossen, et al. (1998). "IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells." Bone Marrow Transplant **22**(10): 1005-1010.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-758.
- Bruck, F., L. Belle, et al. (2013). "Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease." Cytotherapy **15**(3): 267-279.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunstein, C. G., E. J. Fuchs, et al. (2011). "Alternative donor transplantation: results of parallel phase II trials using HLA-mismatched related bone marrow or unrelated umbilical cord blood grafts." Blood.
- Brunstein, C. G., J. S. Miller, et al. (2011). "Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics." Blood **117**(3): 1061-1070.
- Bucher, C., L. Koch, et al. (2009). "IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation." Blood **114**(26): 5375-5384.
- Calcaterra, C., L. Sfondrini, et al. (2008). "Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease." J Immunol **181**(9): 6132-6139.
- Campagnoli, M. F., E. Garelli, et al. (2004). "Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature." Haematologica **89**(4): 480-489.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.
- Carella, A. M., R. Champlin, et al. (2000). "Mini-allografts: ongoing trials in humans." Bone Marrow Transplant **25**(4): 345-350.
- Carlson, M. J., M. L. West, et al. (2009). "In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations." Blood **113**(6): 1365-1374.
- Chabannes, D., M. Hill, et al. (2007). "A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells." Blood **110**(10): 3691-3694.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-2749.
- Chen, B. J., R. E. Morris, et al. (2000). "Graft-versus-host disease prevention by rapamycin: cellular mechanisms." Biol Blood Marrow Transplant **6**(5A): 529-536.
- Chen, X., R. Das, et al. (2009). "Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease." Blood **114**(4): 891-900.
- Chi, H. (2012). "Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions." Nat Rev Immunol **12**(5): 325-338.
- Choi, J., J. Ritchey, et al. (2010). "In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease without sacrificing graft-versus-leukemia." Blood **116**(1): 129-139.
- Choi, S. W., P. Stiff, et al. (2012). "TNF-inhibition with etanercept for graft-versus-host disease prevention in high-risk HCT: lower TNFR1 levels correlate with better outcomes." Biol Blood Marrow Transplant **18**(10): 1525-1532.

- Christensen, M. E., B. E. Turner, et al. (2010). "Mesenchymal stromal cells transiently alter the inflammatory milieu post-transplant to delay graft-versus-host disease." Haematologica **95**(12): 2102-2110.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, et al. (2006). "Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells." Blood **107**(3): 1018-1023.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, et al. (2007). "Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells." Bone Marrow Transplant **39**(9): 537-545.
- Collison, L. W., V. Chaturvedi, et al. (2010). "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population." Nat Immunol **11**(12): 1093-1101.
- Collison, L. W. and D. A. Vignali (2008). "Interleukin-35: odd one out or part of the family?" Immunol Rev **226**: 248-262.
- Cooke, K. R., A. Gerbitz, et al. (2001). "LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation." J Clin Invest **107**(12): 1581-1589.
- Cooke, K. R., G. R. Hill, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation." Transplantation **70**(2): 272-279.
- Corcione, A., F. Benvenuto, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." Blood **107**(1): 367-372.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-635.
- Cutler, C., H. T. Kim, et al. (2004). "Sirolimus and tacrolimus without methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis after matched related donor peripheral blood stem cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **10**(5): 328-336.
- Cutler, C., S. Li, et al. (2007). "Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation." Blood **109**(7): 3108-3114.
- Deeg, H. J. (2007). "How I treat refractory acute GVHD." Blood **109**(10): 4119-4126.
- Delgoffe, G. M., T. P. Kole, et al. (2009). "The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment." Immunity **30**(6): 832-844.
- Delorme, B., J. Ringe, et al. (2008). "Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells." Blood **111**(5): 2631-2635.
- Deng, W., Q. Han, et al. (2005). "Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice." DNA Cell Biol **24**(7): 458-463.
- Di Ianni, M., F. Falzetti, et al. (2011). "Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation." Blood **117**(14): 3921-3928.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-3843.
- Dickinson, A. M., X. N. Wang, et al. (2002). "In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens." Nat Med **8**(4): 410-414.
- Djouad, F., V. Fritz, et al. (2005). "Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **52**(5): 1595-1603.
- Donahue, A. C. and D. A. Fruman (2003). "Proliferation and survival of activated B cells requires sustained antigen receptor engagement and phosphoinositide 3-kinase activation." J Immunol **170**(12): 5851-5860.
- Drobyski, W. R., M. Pasquini, et al. (2011). "Tocilizumab for the treatment of steroid refractory graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **17**(12): 1862-1868.
- Duffy, M. M., J. Pindjakova, et al. (2011). "Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor." Eur J Immunol **41**(10): 2840-2851.

- Duijvestein, M., A. C. Vos, et al. (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." Gut **59**(12): 1662-1669.
- Duramad, O., A. Laysang, et al. (2011). "Pharmacologic expansion of donor-derived, naturally occurring CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells reduces acute graft-versus-host disease lethality without abrogating the graft-versus-leukemia effect in murine models." Biol Blood Marrow Transplant **17**(8): 1154-1168.
- Edinger, M. and P. Hoffmann (2011). "Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences." Curr Opin Immunol **23**(5): 679-684.
- Edinger, M., P. Hoffmann, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation." Nat Med **9**(9): 1144-1150.
- English, K., F. P. Barry, et al. (2007). "IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells." Immunol Lett **110**(2): 91-100.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-242.
- Ermann, J., P. Hoffmann, et al. (2005). "Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD." Blood **105**(5): 2220-2226.
- Favier, B., J. Lemaoult, et al. (2010). "ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse." FASEB J **24**(3): 689-699.
- Ferrara, J. L. (2002). "Cellular and cytokine effectors of acute graft versus host disease." Int J Hematol **76 Suppl 1**: 195-198.
- Filipovich, A. H., D. Weisdorf, et al. (2005). "National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report." Biol Blood Marrow Transplant **11**(12): 945-956.
- Flowers, M. E., E. Kansu, et al. (1999). "Pathophysiology and treatment of graft-versus-host disease." Hematol Oncol Clin North Am **13**(5): 1091-1112, viii-ix.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fowler, D. H. and R. E. Gress (2000). "Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma." Leuk Lymphoma **38**(3-4): 221-234.
- Francois, M., R. Romieu-Mourez, et al. (2012). "Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation." Mol Ther **20**(1): 187-195.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, et al. (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation **6**(2): 230-247.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-390.
- Gang, E. J., D. Bosnakovski, et al. (2007). "SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow." Blood **109**(4): 1743-1751.
- Gangloff, Y. G., M. Mueller, et al. (2004). "Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development." Mol Cell Biol **24**(21): 9508-9516.
- Gao, W., Y. Lu, et al. (2007). "Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells." Am J Transplant **7**(7): 1722-1732.
- Glennie, S., I. Soeiro, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells." Blood **105**(7): 2821-2827.
- Glucksberg, H., R. Storb, et al. (1974). "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors." Transplantation **18**(4): 295-304.

- Godfrey, W. R., D. J. Spoden, et al. (2005). "Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function." Blood **105**(2): 750-758.
- Gonzalez, M. A., E. Gonzalez-Rey, et al. (2009). "Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses." Gastroenterology **136**(3): 978-989.
- Gorin, N. C., S. Piantadosi, et al. (2002). "Increased risk of lethal graft-versus-host disease-like syndrome after transplantation into NOD/SCID mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood." J Hematother Stem Cell Res **11**(2): 277-292.
- Gotherstrom, C., A. West, et al. (2005). "Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells." Haematologica **90**(8): 1017-1026.
- Gregoire-Gauthier, J., S. Selleri, et al. (2011). "Therapeutic Efficacy of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Prevention of Acute Graft-Versus-Host Disease in a Xenogenic Mouse Model." Stem Cells Dev.
- Greiner, D. L., R. A. Hesselton, et al. (1998). "SCID mouse models of human stem cell engraftment." Stem Cells **16**(3): 166-177.
- Guichelaar, T., M. E. Emmelot, et al. (2013). "Human regulatory T cells do not suppress the antitumor immunity in the bone marrow: a role for bone marrow stromal cells in neutralizing regulatory T cells." Clin Cancer Res **19**(6): 1467-1475.
- Hackstein, H., T. Taner, et al. (2003). "Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo." Blood **101**(11): 4457-4463.
- Hannon, M., C. Lechanteur, et al. (2013). "Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease." Transfusion.
- Hass, R., C. Kasper, et al. (2011). "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC." Cell Commun Signal **9**: 12.
- Hesselton, R. M., D. L. Greiner, et al. (1995). "High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice." J Infect Dis **172**(4): 974-982.
- Hill, J. A., M. Feuerer, et al. (2007). "Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature." Immunity **27**(5): 786-800.
- Hippen, K. L., C. Bucher, et al. (2012). "Blocking IL-21 signaling ameliorates xenogeneic GVHD induced by human lymphocytes." Blood **119**(2): 619-628.
- Hippen, K. L., P. Harker-Murray, et al. (2008). "Umbilical cord blood regulatory T-cell expansion and functional effects of tumor necrosis factor receptor family members OX40 and 4-1BB expressed on artificial antigen-presenting cells." Blood **112**(7): 2847-2857.
- Hippen, K. L., S. C. Merkel, et al. (2011). "Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease." Am J Transplant **11**(6): 1148-1157.
- Hiramatsu, H., R. Nishikomori, et al. (2003). "Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammacnull mice model." Blood **102**(3): 873-880.
- Hiwase, S. D., P. G. Dyson, et al. (2009). "Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice." Stem Cells **27**(9): 2293-2300.
- Hoffmann-Fezer, G., C. Gall, et al. (1993). "Immunohistology and immunocytology of human T-cell chimerism and graft-versus-host disease in SCID mice." Blood **81**(12): 3440-3448.
- Hogan, W. J., M. T. Little, et al. (2003). "Postgrafting immunosuppression with sirolimus and cyclosporine facilitates stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given sublethal total body irradiation before marrow transplantation from DLA-identical littermates." Biol Blood Marrow Transplant **9**(8): 489-495.
- Holler, E., H. J. Kolb, et al. (1993). "Treatment of GVHD--TNF-antibodies and related antagonists." Bone Marrow Transplant **12 Suppl 3**: S29-31.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

- Horowitz, M. M., R. P. Gale, et al. (1990). "Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation." *Blood* **75**(3): 555-562.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2008). "Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other." *Trends Immunol* **29**(9): 429-435.
- Horwitz, E. M., K. Le Blanc, et al. (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **7**(5): 393-395.
- Huntington, N. D., N. LeGrand, et al. (2009). "IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo." *J Exp Med* **206**(1): 25-34.
- Iclozan, C., Y. Yu, et al. (2010). "T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease." *Biol Blood Marrow Transplant* **16**(2): 170-178.
- Igura, K., X. Zhang, et al. (2004). "Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta." *Cytotherapy* **6**(6): 543-553.
- Illarregui, J. M., G. A. Bianco, et al. (2005). "The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders." *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 4**: iv96-103.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." *Haematologica* **88**(8): 845-852.
- Ito, M., H. Hiramatsu, et al. (2002). "NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells." *Blood* **100**(9): 3175-3182.
- Ito, R., I. Katano, et al. (2009). "Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice." *Transplantation* **87**(11): 1654-1658.
- Jiang, X. X., Y. Zhang, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **105**(10): 4120-4126.
- Jones, S. C., G. F. Murphy, et al. (2003). "Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response." *Biol Blood Marrow Transplant* **9**(4): 243-256.
- Kamimura, D. and M. J. Bevan (2007). "Naive CD8+ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo." *J Exp Med* **204**(8): 1803-1812.
- Kappel, L. W., G. L. Goldberg, et al. (2009). "IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease." *Blood* **113**(4): 945-952.
- Karussis, D., C. Karageorgiou, et al. (2010). "Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis." *Arch Neurol* **67**(10): 1187-1194.
- Kawano, Y., H. T. Kim, et al. (2011). "Low telomerase activity in CD4+ regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* **118**(18): 5021-5030.
- Kebriaei, P., L. Isola, et al. (2009). "Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease." *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(7): 804-811.
- Kern, S., H. Eichler, et al. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." *Stem Cells* **24**(5): 1294-1301.
- King, M. A., L. Covassin, et al. (2009). "Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex." *Clin Exp Immunol* **157**(1): 104-118.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, et al. (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* **18**(2): 307-316.
- Kollet, O., A. Peled, et al. (2000). "beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function." *Blood* **95**(10): 3102-3105.
- Kopf, H., G. M. de la Rosa, et al. (2007). "Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells." *Int Immunopharmacol* **7**(13): 1819-1824.

- Koreth, J., K. Matsuoka, et al. (2011). "Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease." N Engl J Med **365**(22): 2055-2066.
- Krampera, M., L. Cosmi, et al. (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(2): 386-398.
- Krampera, M., S. Glennie, et al. (2003). "Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide." Blood **101**(9): 3722-3729.
- Krenger, W., G. Falzarano, et al. (1996). "Interferon-gamma suppresses T-cell proliferation to mitogen via the nitric oxide pathway during experimental acute graft-versus-host disease." Blood **88**(3): 1113-1121.
- Kroemer, A., X. Xiao, et al. (2007). "OX40 controls functionally different T cell subsets and their resistance to depletion therapy." J Immunol **179**(8): 5584-5591.
- Kuci, S., Z. Kuci, et al. (2010). "CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties." Haematologica **95**(4): 651-659.
- Laplante, M. and D. M. Sabatini (2009). "An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis." Curr Biol **19**(22): R1046-1052.
- Lazarus, A. H., A. R. Crow, et al. (1997). "Induction of a secondary human anti-HLA alloimmune response in severe combined immunodeficient mice engrafted with human lymphocytes." Transfusion **37**(11-12): 1192-1199.
- Lazarus, H. M., O. N. Koc, et al. (2005). "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients." Biol Blood Marrow Transplant **11**(5): 389-398.
- Le Blanc, K., F. Frassoni, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." Lancet **371**(9624): 1579-1586.
- Le Blanc, K., C. Gotherstrom, et al. (2005). "Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta." Transplantation **79**(11): 1607-1614.
- Lee, R. H., M. J. Seo, et al. (2006). "Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17438-17443.
- Lee, S. H., M. W. Lee, et al. (2013). "Co-transplantation of third-party umbilical cord blood-derived MSCs promotes engraftment in children undergoing unrelated umbilical cord blood transplantation." Bone Marrow Transplant.
- Lee, S. J., G. Vogelsang, et al. (2003). "Chronic graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **9**(4): 215-233.
- Lee, W. S., Y. Suzuki, et al. (2011). "Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **17**(4): 465-475.
- Leveson-Gower, D. B., J. A. Olson, et al. (2011). "Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism." Blood **117**(11): 3220-3229.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells." J Immunol **166**(9): 5530-5539.
- Li, F., X. Wang, et al. (2010). "Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta." Bone **47**(3): 546-555.
- Li, H., Z. Guo, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease." Stem Cells **26**(10): 2531-2541.
- Li, H., C. Matte-Martone, et al. (2011). "Graft-versus-host disease is independent of innate signaling pathways triggered by pathogens in host hematopoietic cells." J Immunol **186**(1): 230-241.
- Li, L., W. R. Godfrey, et al. (2005). "CD4+CD25+ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy." Blood **106**(9): 3068-3073.

- Li, Y., X. C. Li, et al. (1999). "Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance." Nat Med **5**(11): 1298-1302.
- Lim, J. H., J. S. Kim, et al. (2010). "Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node." J Immunol **185**(7): 4022-4029.
- Liotta, F., R. Angeli, et al. (2008). "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling." Stem Cells **26**(1): 279-289.
- Liu, H., K. Lu, et al. (2012). "Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cells." J Cell Sci **125**(Pt 1): 200-208.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.
- Liu, Y., P. Zhang, et al. (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-640.
- Lord, J. D., R. C. Hackman, et al. (2011). "Blood and gastric FOXP3+ T cells are not decreased in human gastric graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **17**(4): 486-496.
- Lu, L. and H. Cantor (2008). "Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells." Cell Mol Immunol **5**(6): 401-406.
- Lucchini, G., M. Introna, et al. (2010). "Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population." Biol Blood Marrow Transplant **16**(9): 1293-1301.
- Lui, S. L., R. Tsang, et al. (2008). "Rapamycin attenuates the severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice." Nephrol Dial Transplant **23**(9): 2768-2776.
- Maccario, R., M. Podesta, et al. (2005). "Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype." Haematologica **90**(4): 516-525.
- Macmillan, M. L., B. R. Blazar, et al. (2009). "Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial." Bone Marrow Transplant **43**(6): 447-454.
- MacMillan, M. L., D. J. Weisdorf, et al. (2009). "Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors." Blood **113**(11): 2410-2415.
- Makino, S., K. Fukuda, et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest **103**(5): 697-705.
- Malek, T. R. and A. L. Bayer (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." Nat Rev Immunol **4**(9): 665-674.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." J Exp Med **201**(7): 1061-1067.
- Martel, R. R., J. Klicius, et al. (1977). "Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic." Can J Physiol Pharmacol **55**(1): 48-51.
- Martin, P. J., J. D. Rizzo, et al. (2012). "First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **18**(8): 1150-1163.
- Mathias, C., R. Mick, et al. (2000). "Soluble interleukin-2 receptor concentration as a biochemical indicator for acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Hematother Stem Cell Res **9**(3): 393-400.
- Matsuoka, K., H. T. Kim, et al. (2010). "Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." J Clin Invest **120**(5): 1479-1493.
- McDermott, S. P., K. Eppert, et al. (2010). "Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains." Blood **116**(2): 193-200.

- Meisel, R., S. Brockers, et al. (2011). "Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." *Leukemia* **25**(4): 648-654.
- Meisel, R., A. Zibert, et al. (2004). "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation." *Blood* **103**(12): 4619-4621.
- Meuleman, N., T. Tondreau, et al. (2009). "Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study." *Stem Cells Dev* **18**(9): 1247-1252.
- Mielcarek, M., R. Storb, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells fail to prevent acute graft-versus-host disease and graft rejection after dog leukocyte antigen-haploidentical bone marrow transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* **17**(2): 214-225.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol* **4**(11): 841-855.
- Miura, M., Y. Miura, et al. (2006). "Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation." *Stem Cells* **24**(4): 1095-1103.
- Miura, Y., C. J. Thoburn, et al. (2004). "Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease." *Blood* **104**(7): 2187-2193.
- Miyamoto, T., K. Akashi, et al. (1996). "Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease." *Bone Marrow Transplant* **17**(2): 185-190.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, et al. (2009). "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor." *Immunity* **30**(6): 899-911.
- Mosier, D. E., R. J. Gulizia, et al. (1988). "Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency." *Nature* **335**(6187): 256-259.
- Mougiakakos, D., R. Jitschin, et al. (2011). "The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells." *Blood* **117**(18): 4826-4835.
- Muguruma, Y., T. Yahata, et al. (2006). "Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment." *Blood* **107**(5): 1878-1887.
- Munz, C. (2009). "Enhancing immunity through autophagy." *Annu Rev Immunol* **27**: 423-449.
- Mutis, T., R. S. van Rijn, et al. (2006). "Human regulatory T cells control xenogeneic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2-/-gammac-/- immunodeficient mice." *Clin Cancer Res* **12**(18): 5520-5525.
- Nadal, E., M. Garin, et al. (2007). "Increased frequencies of CD4(+)CD25(high) T(regs) correlate with disease relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia." *Leukemia* **21**(3): 472-479.
- Najar, M., G. Raicevic, et al. (2010). "Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources." *Cell Immunol* **264**(2): 171-179.
- Najar, M., G. Raicevic, et al. (2010). "Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions." *Exp Hematol* **38**(10): 922-932.
- Najar, M., R. Rouas, et al. (2009). "Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6." *Cytotherapy* **11**(5): 570-583.
- Nasef, A., C. Mazurier, et al. (2008). "Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression." *Cell Immunol* **253**(1-2): 16-22.
- Nasef, A., Y. Z. Zhang, et al. (2009). "Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation." *Int J Lab Hematol* **31**(1): 9-19.
- Nauta, A. J. and W. E. Fibbe (2007). "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells." *Blood* **110**(10): 3499-3506.

- Nauta, A. J., G. Westerhuis, et al. (2006). "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting." Blood **108**(6): 2114-2120.
- Nelson, B. H. (2004). "IL-2, regulatory T cells, and tolerance." J Immunol **172**(7): 3983-3988.
- Nelson, E. A., S. R. Walker, et al. (2006). "Identification of human STAT5-dependent gene regulatory elements based on interspecies homology." J Biol Chem **281**(36): 26216-26224.
- Nervi, B., M. P. Rettig, et al. (2007). "Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice." Exp Hematol **35**(12): 1823-1838.
- Niedbala, W., B. Cai, et al. (2006). "Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions." Ann Rheum Dis **65 Suppl 3**: iii37-40.
- Niederhorn, J. Y. (2008). "Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells." Curr Opin Immunol **20**(3): 327-331.
- Nikolic, B., S. Lee, et al. (2000). "Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets." J Clin Invest **105**(9): 1289-1298.
- Ning, H., F. Yang, et al. (2008). "The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study." Leukemia **22**(3): 593-599.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science **166**(906): 753-755.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science **166**(3906): 753-755.
- Noort, W. A., A. B. Kruisselbrink, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice." Exp Hematol **30**(8): 870-878.
- O'Connell, R. M., A. B. Balazs, et al. (2010). "Lentiviral vector delivery of human interleukin-7 (hIL-7) to human immune system (HIS) mice expands T lymphocyte populations." PLoS ONE **5**(8): e12009.
- Oswald, J., S. Boxberger, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro." Stem Cells **22**(3): 377-384.
- Otterbein, L. E. and A. M. Choi (2000). "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1029-1037.
- Pabst, C., H. Schirutschke, et al. (2007). "The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors." Clin Cancer Res **13**(10): 2916-2922.
- Paczesny, S., D. Hanauer, et al. (2010). "New perspectives on the biology of acute GVHD." Bone Marrow Transplant **45**(1): 1-11.
- Palmer, J. M., B. J. Chen, et al. (2010). "Novel mechanism of rapamycin in GVHD: increase in interstitial regulatory T cells." Bone Marrow Transplant **45**(2): 379-384.
- Peluso, I., M. C. Fantini, et al. (2007). "IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes." J Immunol **178**(2): 732-739.
- Penack, O., E. Holler, et al. (2010). "Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors." Blood **115**(10): 1865-1872.
- Piguet, P. F., G. E. Grau, et al. (1987). "Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease." J Exp Med **166**(5): 1280-1289.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Polchert, D., J. Sobinsky, et al. (2008). "IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease." Eur J Immunol **38**(6): 1745-1755.
- Porter, D. L., R. H. Collins, Jr., et al. (2000). "Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions." Blood **95**(4): 1214-1221.
- Powell, J. D., K. N. Pollizzi, et al. (2012). "Regulation of immune responses by mTOR." Annu Rev Immunol **30**: 39-68.

- Prasad, V. K., K. G. Lucas, et al. (2011). "Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study." Biol Blood Marrow Transplant **17**(4): 534-541.
- Prasanna, S. J., D. Gopalakrishnan, et al. (2010). "Pro-inflammatory cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially." PLoS ONE **5**(2): e9016.
- Prigozhina, T. B., S. Khitritin, et al. (2008). "Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation." Exp Hematol **36**(10): 1370-1376.
- Procaccini, C., V. De Rosa, et al. (2010). "An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness." Immunity **33**(6): 929-941.
- Procaccini, C. and G. Matarese (2012). "Regulatory T cells, mTOR kinase, and metabolic activity." Cell Mol Life Sci.
- Proud, C. G. (2007). "Amino acids and mTOR signalling in anabolic function." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1187-1190.
- Przepiora, D., D. Weisdorf, et al. (1995). "1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading." Bone Marrow Transplant **15**(6): 825-828.
- Qian, X., K. Wang, et al. (2011). "Generation of human regulatory T cells de novo with suppressive function prevent xenogeneic graft versus host disease." Int Immunopharmacol **11**(5): 630-637.
- Quirici, N., D. Soligo, et al. (2002). "Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies." Exp Hematol **30**(7): 783-791.
- Rafei, M., J. Hsieh, et al. (2008). "Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction." Blood **112**(13): 4991-4998.
- Raicevic, G., M. Najjar, et al. (2011). "The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties." Cell Immunol **270**(2): 207-216.
- Raicevic, G., R. Rouas, et al. (2010). "Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells." Hum Immunol **71**(3): 235-244.
- Rao, R. R., Q. Li, et al. (2010). "The mTOR kinase determines effector versus memory CD8 $^{+}$  T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin." Immunity **32**(1): 67-78.
- Rasmusson, I., O. Ringden, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms." Exp Cell Res **305**(1): 33-41.
- Ratajczak, P., A. Janin, et al. (2010). "Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease." Blood **116**(7): 1165-1171.
- Ratanatharathorn, V., B. Logan, et al. (2009). "Prior rituximab correlates with less acute graft-versus-host disease and better survival in B-cell lymphoma patients who received allogeneic peripheral blood stem cell transplantation." Br J Haematol **145**(6): 816-824.
- Reddy, P., T. Teshima, et al. (2001). "Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis." J Exp Med **194**(10): 1433-1440.
- Reichardt, W., C. Durr, et al. (2008). "Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation." J Immunol **181**(7): 4770-4779.
- Ren, G., L. Zhang, et al. (2008). "Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide." Cell Stem Cell **2**(2): 141-150.
- Rezvani, K. and A. J. Barrett (2008). "Characterizing and optimizing immune responses to leukaemia antigens after allogeneic stem cell transplantation." Best Pract Res Clin Haematol **21**(3): 437-453.
- Rezvani, K., S. Mielke, et al. (2006). "High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT." Blood **108**(4): 1291-1297.
- Rider, D. A., T. Nalathamby, et al. (2007). "Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells." J Mol Histol **38**(5): 449-458.

- Rieger, K., C. Loddenkemper, et al. (2006). "Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD." *Blood* **107**(4): 1717-1723.
- Ringden, O., M. Uzunel, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease." *Transplantation* **81**(10): 1390-1397.
- Riteau, B., N. Rouas-Freiss, et al. (2001). "HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity." *J Immunol* **166**(8): 5018-5026.
- Robb, R. J., K. E. Lineburg, et al. (2012). "Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation." *Blood* **119**(24): 5898-5908.
- Rocha, V., J. E. Wagner, Jr., et al. (2000). "Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources." *N Engl J Med* **342**(25): 1846-1854.
- Rodriguez, R., A. Nademanee, et al. (2010). "Thymoglobulin, CYA and mycophenolate mofetil as GVHD prophylaxis for reduced-intensity unrelated donor hematopoietic cell transplantation: beneficial effect seen on chronic GVHD." *Bone Marrow Transplant* **45**(1): 205-207.
- Rodriguez, R., R. Nakamura, et al. (2010). "A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens." *Blood* **115**(5): 1098-1105.
- Romieu-Mourez, R., M. Francois, et al. (2009). "Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype." *J Immunol* **182**(12): 7963-7973.
- Rosenzwajg, M., N. Dhedin, et al. (2011). "Regulatory T cell content in the bone marrow graft does not predict the occurrence of acute GVHD." *Biol Blood Marrow Transplant* **17**(2): 265-269.
- Rowlings, P. A., D. Przepiorka, et al. (1997). "IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade." *Br J Haematol* **97**(4): 855-864.
- Rozmus, J. and K. R. Schultz (2011). "Biomarkers in chronic graft-versus-host disease." *Expert Rev Hematol* **4**(3): 329-342.
- Rubio, M. T., L. Moreira-Teixeira, et al. (2012). "Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival." *Blood* **120**(10): 2144-2154.
- Ruggeri, L., M. Capanni, et al. (2002). "Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants." *Science* **295**(5562): 2097-2100.
- Ryan, J. M., F. Barry, et al. (2007). "Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells." *Clin Exp Immunol* **149**(2): 353-363.
- Saito, K., J. Sakurai, et al. (1998). "Involvement of CD40 ligand-CD40 and CTLA4-B7 pathways in murine acute graft-versus-host disease induced by allogeneic T cells lacking CD28." *J Immunol* **160**(9): 4225-4231.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
- Sanchez-Abarca, L. I., S. Gutierrez-Cosio, et al. (2010). "Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting." *Blood* **115**(1): 107-121.
- Sandhu, J. S., R. Gorchynski, et al. (1995). "A human model of xenogeneic graft-versus-host disease in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes." *Transplantation* **60**(2): 179-184.
- Santini, S. M., M. Spada, et al. (1998). "Treatment of severe combined immunodeficiency mice with anti-murine granulocyte monoclonal antibody improves human leukocyte xenotransplantation." *Transplantation* **65**(3): 416-420.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, et al. (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." *Mol Cell* **22**(2): 159-168.

- Sato, K., K. Ozaki, et al. (2007). "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells." Blood **109**(1): 228-234.
- Sawamukai, N., A. Satake, et al. (2012). "Cell-autonomous role of TGFbeta and IL-2 receptors in CD4+ and CD8+ inducible regulatory T-cell generation during GVHD." Blood **119**(23): 5575-5583.
- Schmelzle, T. and M. N. Hall (2000). "TOR, a central controller of cell growth." Cell **103**(2): 253-262.
- Schmidt, M. R., M. C. Appel, et al. (2008). "Human BLYS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice." PLoS ONE **3**(9): e3192.
- Schultz, K. R., J. Paquet, et al. (1995). "Requirement for B cells in T cell priming to minor histocompatibility antigens and development of graft-versus-host disease." Bone Marrow Transplant **16**(2): 289-295.
- Segundo, D. S., J. C. Ruiz, et al. (2006). "Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients." Transplantation **82**(4): 550-557.
- Selmani, Z., A. Naji, et al. (2009). "HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells." Transplantation **87**(9 Suppl): S62-66.
- Selmani, Z., A. Naji, et al. (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." Stem Cells **26**(1): 212-222.
- Sheng, H., Y. Wang, et al. (2008). "A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1." Cell Res **18**(8): 846-857.
- Shevach, E. M., R. A. DiPaolo, et al. (2006). "The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells." Immunol Rev **212**: 60-73.
- Shibata, S., T. Asano, et al. (1998). "Peritoneal macrophages play an important role in eliminating human cells from severe combined immunodeficient mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes." Immunology **93**(4): 524-532.
- Shin, H. J., J. Baker, et al. (2011). "Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Blood **118**(8): 2342-2350.
- Shlomchik, W. D. (2007). "Graft-versus-host disease." Nat Rev Immunol **7**(5): 340-352.
- Shulman, H. M., K. M. Sullivan, et al. (1980). "Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients." Am J Med **69**(2): 204-217.
- Shultz, L. D., M. A. Brehm, et al. (2011). "Humanized mice as a preclinical tool for infectious disease and biomedical research." Ann N Y Acad Sci **1245**: 50-54.
- Shultz, L. D., B. L. Lyons, et al. (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." J Immunol **174**(10): 6477-6489.
- Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." J Immunol **154**(1): 180-191.
- Simmons, P. J., S. Gronthos, et al. (1994). "Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis." Prog Clin Biol Res **389**: 271-280.
- Sinclair, L. V., D. Finlay, et al. (2008). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking." Nat Immunol **9**(5): 513-521.
- Sioud, M., A. Mobergslien, et al. (2011). "Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins." Int J Oncol **38**(2): 385-390.
- Sotiropoulou, P. A., S. A. Perez, et al. (2006). "Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research." Stem Cells **24**(5): 1409-1410.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." Blood **107**(4): 1484-1490.
- Spaggiari, G. M. and L. Moretta (2012). "Interactions Between Mesenchymal Stem Cells and Dendritic Cells." Adv Biochem Eng Biotechnol.
- Stephens, G. L., J. Andersson, et al. (2007). "Distinct subsets of FoxP3+ regulatory T cells participate in the control of immune responses." J Immunol **178**(11): 6901-6911.

- Storb, R., J. H. Antin, et al. (2010). "Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease?" Biol Blood Marrow Transplant **16**(1 Suppl): S18-27.
- Storb, R., C. Yu, et al. (1999). "Stable mixed hematopoietic chimerism in dog leukocyte antigen-identical littermate dogs given lymph node irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplantation." Blood **94**(3): 1131-1136.
- Strauss, L., M. Czystowska, et al. (2009). "Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin." PLoS ONE **4**(6): e5994.
- Strauss, L., T. L. Whiteside, et al. (2007). "Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin." J Immunol **178**(1): 320-329.
- Sudres, M., F. Norol, et al. (2006). "Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice." J Immunol **176**(12): 7761-7767.
- Symington, F. W., B. E. Symington, et al. (1992). "The relationship of serum IL-6 levels to acute graft-versus-host disease and hepatorenal disease after human bone marrow transplantation." Transplantation **54**(3): 457-462.
- Tawara, I., Y. Maeda, et al. (2008). "Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease." Exp Hematol **36**(8): 988-996.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)/CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-3499.
- Taylor, P. A., A. Panoskaltis-Mortari, et al. (2004). "L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4+25+ T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection." Blood **104**(12): 3804-3812.
- Thomas, E., R. Storb, et al. (1975). "Bone-marrow transplantation (first of two parts)." N Engl J Med **292**(16): 832-843.
- Thomson, A. W., H. R. Turnquist, et al. (2009). "Immunoregulatory functions of mTOR inhibition." Nat Rev Immunol **9**(5): 324-337.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, et al. (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." J Immunol **172**(11): 6519-6523.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-190.
- Tisato, V., K. Naresh, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease." Leukemia **21**(9): 1992-1999.
- Tobin, L. M., M. E. Healy, et al. (2013). "Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease." Clin Exp Immunol **172**(2): 333-348.
- Tournoy, K. G., S. Depraetere, et al. (1998). "Murine IL-2 receptor beta chain blockade improves human leukocyte engraftment in SCID mice." Eur J Immunol **28**(10): 3221-3230.
- Traggiai, E., L. Chicha, et al. (2004). "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice." Science **304**(5667): 104-107.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, et al. (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation." Transplantation **75**(3): 389-397.
- Turnquist, H. R., G. Raimondi, et al. (2007). "Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance." J Immunol **178**(11): 7018-7031.
- Valmori, D., V. Tosello, et al. (2006). "Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells." J Immunol **177**(2): 944-949.
- Vasaghi, A., A. Dehghani, et al. (2013). "Parameters that influence the isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from human umbilical cord blood." Hematol Oncol Stem Cell Ther **6**(1): 1-8.

- Vercoulen, Y., T. Guichelaar, et al. (2012). "Application of cultured human regulatory T cells requires preclinical in vivo evaluation." *J Allergy Clin Immunol* **129**(3): 852-855 e853.
- Vezina, C., A. Kudelski, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." *J Antibiot (Tokyo)* **28**(10): 721-726.
- Villaron, E. M., J. Almeida, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Haematologica* **89**(12): 1421-1427.
- von Bahr, L., B. Sundberg, et al. (2012). "Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy." *Biol Blood Marrow Transplant* **18**(4): 557-564.
- von Bonin, M., F. Stolzel, et al. (2009). "Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium." *Bone Marrow Transplant* **43**(3): 245-251.
- Wagener, F. A., H. D. Volk, et al. (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." *Pharmacol Rev* **55**(3): 551-571.
- Wang, Y., U. J. Kim, et al. (2005). "In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells." *Biomaterials* **26**(34): 7082-7094.
- Waterman, R. S., S. L. Tomchuck, et al. (2010). "A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype." *PLoS ONE* **5**(4): e10088.
- Weng, J. Y., X. Du, et al. (2010). "Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD." *Bone Marrow Transplant* **45**(12): 1732-1740.
- Wenzel, P., M. Oelze, et al. (2007). "Heme oxygenase-1: a novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(8): 1729-1735.
- Wexler, S. A., C. Donaldson, et al. (2003). "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not." *Br J Haematol* **121**(2): 368-374.
- Wolf, D., A. M. Wolf, et al. (2007). "Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation." *Transplantation* **83**(8): 1107-1113.
- Xu, J., D. Wang, et al. (2012). "Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome." *Blood* **120**(15): 3142-3151.
- Yanez, R., M. L. Lamana, et al. (2006). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease." *Stem Cells* **24**(11): 2582-2591.
- Yang, R. Y., G. A. Rabinovich, et al. (2008). "Galectins: structure, function and therapeutic potential." *Expert Rev Mol Med* **10**: e17.
- Yi, T., D. Zhao, et al. (2008). "Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease." *Blood* **112**(5): 2101-2110.
- Yong, P. L., P. Russo, et al. (2008). "Use of sirolimus in IPEX and IPEX-like children." *J Clin Immunol* **28**(5): 581-587.
- Yoo, K. H., I. K. Jang, et al. (2009). "Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues." *Cell Immunol* **259**(2): 150-156.
- Yoshino, H., T. Ueda, et al. (2000). "Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice." *Bone Marrow Transplant* **26**(11): 1211-1216.
- Zappia, E., S. Casazza, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy." *Blood* **106**(5): 1755-1761.
- Zeddou, M., A. Briquet, et al. (2010). "The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood." *Cell Biol Int* **34**(7): 693-701.
- Zeiser, R., D. B. Leveson-Gower, et al. (2008). "Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells." *Blood* **111**(1): 453-462.
- Zeiser, R. and R. S. Negrin (2008). "Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy." *Cell Cycle* **7**(4): 458-462.

- Zeiser, R., V. H. Nguyen, et al. (2006). "Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production." *Blood* **108**(1): 390-399.
- Zhang, J., Y. Li, et al. (2005). "Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice." *Exp Neurol* **195**(1): 16-26.
- Zhang, Q., S. Shi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis." *J Immunol* **183**(12): 7787-7798.
- Zhang, S., J. A. Readinger, et al. (2011). "Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production." *Blood* **117**(4): 1228-1238.
- Zheng, G., B. Wang, et al. (2004). "The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **173**(4): 2428-2434.
- Zheng, R., L. Wang, et al. (2009). "Inhibition of PKHD1 may cause S-phase entry via mTOR signaling pathway." *Cell Biol Int* **33**(9): 926-933.
- Zhou, H., M. Guo, et al. (2010). "Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report." *Biol Blood Marrow Transplant* **16**(3): 403-412.
- Zorn, E., M. Mohseni, et al. (2009). "Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* **15**(3): 382-388.
- Zorn, E., E. A. Nelson, et al. (2006). "IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo." *Blood* **108**(5): 1571-1579.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* **7**(2): 211-228.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." *Arthritis Res* **2**(6): 477-488.