

Université de Liège – Faculté de Médecine
Doctorat en sciences biomédicales et pharmaceutiques



**Contribution à l'étude de la maladie
du greffon contre l'hôte dans des
modèles de souris humanisées**

Justine Courtois

Laboratoire d'Hématologie – GIGA-I³

Promoteur : Prof. Frédéric Baron

Année académique : 2023-2024

Contribution à l'étude de la maladie du greffon contre l'hôte dans des modèles de souris humanisées

Membres du jury :

Prof. A. Gothot (Président, ULiège)
Prof. F. Baron (Promoteur, ULiège)
Prof. Y. Beguin (ULiège)
Prof. S. Rahmouni (ULiège)
Prof. C. Desmet (ULiège)
Prof. G. Darcis (ULiège)
Dr. G. Ehx (ULiège)
Prof. C. Graux (UCLouvain, Belgique)
Prof. M.-T. Rubio (CHU de Nancy, Nancy, France)

Remerciements

Au terme de cette passionnante aventure académique qui a abouti à la finalisation de ma thèse intitulée "Contribution à l'étude de la maladie du greffon contre l'hôte dans des modèles de souris humanisées", il est essentiel pour moi de prendre un moment pour exprimer ma gratitude envers les personnes qui ont joué des rôles cruciaux à chaque étape de mon parcours professionnel. De mes premiers pas dans le monde du laboratoire en endocrinologie, en passant par mes expériences en chimie clinique couplé au CRJ/HELLo et jusqu'à mes travaux de recherche actuels, chaque personne mentionnée a contribué de manière significative à ma croissance professionnelle et personnelle. Ces remerciements sont une reconnaissance sincère de l'apport de chacun dans la réalisation de ce projet de thèse.

À toi, ma chère Caroline Le Goff je tiens à t'exprimer ma profonde gratitude pour le rôle exceptionnel que tu as joué dans mon parcours professionnel et académique. Ta confiance en moi dès mes premiers pas dans le laboratoire en endocrinologie a été le point de départ d'une aventure professionnelle enrichissante. Tu as été bien plus qu'une responsable de laboratoire, tu as été la personne qui a cru en mes capacités et m'a offert la chance de découvrir le monde passionnant du laboratoire. Grâce à ton soutien, j'ai eu l'opportunité de travailler lors de mes étés dès ma troisième année de bachelier, ce qui m'a permis de m'immerger dans le domaine, d'approfondir mes connaissances et de développer ma confiance en moi. Acceptant de superviser mon travail de fin d'études à la fin de mon master, tu m'as donné l'opportunité de mettre

en pratique les connaissances acquises. Ces premières expériences ont été le début de mon développement professionnel, et je te suis reconnaissante pour tout ce que tu m'as offert. Pendant quatre ans, grâce à toi, j'ai eu le privilège de travailler en chimie clinique, contribuant à des projets passionnants liés à l'allergie alimentaire et au développement de nouvelles méthodologies en spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide. Ces opportunités m'ont permis de m'épanouir professionnellement et de mettre en pratique mes compétences de manière concrète. Au-delà de ces avancées professionnelles, je tiens à souligner l'importance de l'environnement bienveillant et amical que tu as créé. Travailler à tes côtés a été synonyme de collaboration, d'entraide et de convivialité. C'est grâce à toi que j'ai pu non seulement évoluer professionnellement, mais aussi rencontrer des collègues exceptionnels qui sont devenus de véritables amis, je pense à Anne-Pophie, Edwina, Olivier et Nunzio avec qui j'ai toujours la chance de partager de nombreux temps de midi. Aujourd'hui, alors que je finalise ma thèse, je tiens à te remercier du fond du cœur pour l'impact que tu as eu sur ma carrière. Ton mentorat et ton amitié sont des cadeaux précieux que je chérirai toujours.

Et vous, Professeur Cavalier, je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien et votre mentorat tout au long de mon parcours au sein du service de chimie clinique. Votre accueil chaleureux et votre croyance en mes capacités ont été les catalyseurs qui ont façonné mon cheminement professionnel. C'est grâce à votre encouragement constant et à votre détermination à me pousser au-delà de mes limites que j'ai été inspirée à

entreprendre ce voyage académique jusqu'à la réalisation de ma thèse de doctorat. Votre confiance en mes compétences a été le moteur de ma détermination, et sans votre appui infaillible, je n'aurais pas osé m'engager dans ce projet ambitieux. Je tiens à vous remercier du fond du cœur pour l'environnement bienveillant que vous avez instauré dans vos laboratoires. Vos invitations généreuses aux événements d'équipe et aux célébrations ont toujours réchauffé mon cœur, témoignant de la véritable communauté que vous avez créée. Votre humilité en tant que chef et la cohésion que vous avez établie au sein de vos équipes sont une source d'inspiration constante. C'est un honneur d'avoir fait partie de votre équipe et d'avoir pu contribuer à certains de vos projets. Merci de m'avoir offert d'innombrables opportunités d'apprentissage et de croissance professionnelle.

À vous, Birgit Quinting et Stéphanie Collenaere, je tiens également à particulièrement vous remercier pour cette aventure car tout a commencé grâce à vous, à la confiance que vous avez eue en moi. Je vous remercie pour votre soutien, votre encouragement et surtout de m'avoir donné la chance de m'épanouir dans deux projets consécutifs qui ont développé ma passion pour la recherche. Grâce à vous deux, mes débuts dans le monde du travail et de la recherche ont été beaux !

À toi, Fred, je tiens à t'exprimer ma sincère gratitude pour l'opportunité exceptionnelle que tu m'as offerte de réaliser ma thèse de doctorat au sein de ton équipe. Travailler sous ta direction a été une expérience formatrice

qui a profondément enrichi mes compétences en réflexion et en analyse des résultats. Je souhaite te remercier tout particulièrement pour ton ingéniosité inépuisable, tes idées novatrices, et tes interprétations toujours perspicaces. Ton engagement à pousser constamment mes limites a été un moteur qui a contribué à faire de moi, de nous, de meilleurs chercheurs. Cela a été un véritable honneur pour moi de faire partie de ton équipe, entouré de collègues bienveillants, dans un environnement de travail qui a toujours favorisé l'épanouissement. Chaque jour au laboratoire était empreint de motivation et d'un sourire, car ton leadership inspirant et le soutien de l'équipe ont créé une atmosphère où le travail ne semblait jamais être une corvée. Merci de m'avoir permis de contribuer à l'aboutissement de nombreux projets passionnants, une expérience dont je suis profondément fière. Je te suis reconnaissante pour tous les conseils avisés, ton épaule réconfortante, et surtout, pour avoir cru en mes capacités. Ta confiance m'a donné l'opportunité de prendre en charge des projets significatifs et de contribuer à la publication d'articles qui resteront des jalons importants dans ma carrière. En espérant que tu partageras la fierté que je ressens pour le chemin parcouru, je tiens à t'adresser mes plus sincères remerciements.

Et vous, cher Président, Professeur Gothot ainsi qu'à vous chers membres de mon comité de thèse, Professeur Beguin, Professeur Rahmouni, Professeur Desmet, Dr, M.D, Darcis et Dr Hoc, je tiens à vous adresser ma profonde reconnaissance pour la richesse de vos connaissances, votre patience et vos

nombreux conseils tout au long de ce parcours. Votre engagement et votre soutien ont été des guides constants.

À vous, Professeur Beguin et Professeur Caers, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers vous pour avoir accepté mon engagement en vue de la réalisation de ma thèse de doctorat au sein du laboratoire d'hématologie. Votre soutien et votre confiance ont été les piliers sur lesquels reposait la concrétisation de ce projet de recherche. Professeur Beguin, je vous suis reconnaissante d'avoir ouvert cette porte d'opportunités et de m'avoir accordé la chance de contribuer à des travaux aussi passionnants. Professeur Caers, en assumant désormais la responsabilité de chef du laboratoire d'hématologie, vous avez pris le relais avec dévouement et professionnalisme, assurant ainsi la continuité et la réussite de ce projet. Je vous exprime ma reconnaissance pour votre engagement et votre gestion éclairée. Cette expérience au sein du laboratoire d'hématologie restera un chapitre inestimable de ma carrière académique, et je suis reconnaissante envers vous deux pour avoir rendu cela possible.

À vous, chère équipe d'hématologie, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude envers chacun d'entre vous pour le soutien indéfectible, la bonne humeur constante et les échanges passionnants que nous avons partagés au cours de ces années de collaboration. Caroline, Lorenzo, Benoit, Murat, Margaux, Elodie, Michelle, Louise, Charline B., Sophie, Coline, Guillaume, et Grégory, vous avez été bien plus que des collègues ; vous avez été une source

d'inspiration et de réconfort, rendant chaque journée au laboratoire mémorable. Les discussions scientifiques, mais aussi les moments de vie partagés, ont enrichi cette expérience de thèse d'une manière exceptionnelle.

À vous, Coline et Sophie, je tiens à vous exprimer un merci tout particulier pour votre contribution inestimable au sein du laboratoire d'hématologie. Votre expertise, votre dévouement et votre générosité ont grandement enrichi mon parcours de thèse. Votre assistance précieuse dans chaque expérience, vos conseils éclairés, et la formation que vous avez généreusement dispensée sur de nombreuses techniques ont été essentiels à la réussite de nos projets. Vous êtes véritablement les piliers de ce laboratoire, et sans votre dévouement, rien de tout cela ne serait possible. Au-delà de votre expertise professionnelle, vous êtes devenues bien plus que des collègues. Vous êtes devenues des confidentes, des soutiens infaillibles qui ont su nous rebooster lors de moments difficiles, de dépression, et de désespoir. Vous avez également été là pour célébrer nos réussites, que ce soit après une expérience réussie ou lors d'un apéro bien mérité après une longue journée de sacrifice. Votre présence constante, votre engagement et votre esprit d'équipe ont contribué à faire du laboratoire un lieu de travail exceptionnel. Merci mille fois pour votre dévouement et pour avoir été des piliers indispensables tout au long de cette aventure.

À ceux qui ont rejoint l'équipe plus récemment, Osuvin, Charline F, Valentina, Mégane, Bianca, et Cham, je vous souhaite de vivre des années aussi riches et épanouissantes que celles que j'ai eu la chance de partager avec cette équipe exceptionnelle.

Ensemble, nous avons formé une équipe unie, solidaire et passionnée, et je suis ravie d'avoir fait partie de cette belle aventure avec chacun d'entre vous.

À toute l'équipe du GYt, je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers l'institution du GYt et tous ses membres, ainsi que les différentes plateformes qui ont contribué de manière significative à l'aboutissement de ma thèse.

Un merci particulier s'adresse à la plateforme de vecteurs viraux, et spécialement à Manu et Hélène. Leur expertise et leur dévouement à m'enseigner les subtilités de la technologie CRISPR ont été inestimables. Merci pour votre amabilité, votre soutien, et votre générosité dont vous avez toujours fait preuve en partageant vos connaissances. Votre assistance précieuse a grandement contribué au succès de mes projets.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers toute l'équipe de la plateforme d'imagerie et de cytométrie en flux, notamment à Céline, Raafat, Alexandre, Gaëtan, et Pandra. Votre gentillesse, votre soutien constant et votre aide précieuse sur chacun de mes projets ont été des éléments clés de ma réussite. Vous m'avez enseigné tellement de compétences et de savoir-faire que je ne pourrai jamais assez vous remercier.

Un merci tout particulier à Céline, qui est devenue bien plus qu'une collègue. Ces encouragements constants tout au long de ma thèse et de la rédaction ont été une source d'inspiration, et je te suis infiniment reconnaissante d'avoir été à mes côtés tout au long de ce parcours.

À ma chère famille, je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien indéfectible tout au long de mon parcours de thèse. Votre présence, vos encouragements et votre croyance en moi ont été les moteurs de cette aventure, et je vous en suis infiniment reconnaissante.

À mes chers parents, ma maman et Jean-Pierre, mon papa et Marylène, votre soutien inconditionnel a été ma source d'inspiration constante. Votre écoute attentive, vos paroles encourageantes et votre capacité à me rebooster ont été des éléments cruciaux de ma réussite.

À ma sœur Pauline, qui a partagé ce chemin avec moi, merci pour ta présence, tes encouragements et ta compréhension. Nous avons construit ensemble de précieux souvenirs qui resteront gravés dans mon cœur.

À ma grand-mère, merci pour ton amour, tes prières et ta bienveillance. À mon grand-père, parti trop tôt, je ressens encore ton influence positive à chaque étape de ma vie.

À mon parrain, mon tonton, et ma tante Miche, merci pour vos conseils, votre soutien constant et votre présence réconfortante. Ce travail est le fruit de nos liens familiaux solides, et je vous en suis profondément reconnaissante.

À ma chère cousine de cœur Ludivine, ta présence et ton soutien ont été des sources de joie tout au long de cette aventure. Merci pour ton amitié, ta présence, tes appels téléphoniques quotidiens et ton encouragement constants.

À mon cher neveu de cœur Tom, ton sourire espiègle et ta joie de vivre ont été des rayons de soleil constants au cours de cette aventure. Merci d'avoir partagé tes moments d'innocence et de bonheur. Ta présence a rendu cette expérience encore plus spéciale.

Chaque réussite, chaque défi surmonté, je le dédie à vous tous. Voir la fierté dans vos yeux est pour moi une récompense inestimable. Merci d'avoir été mes piliers tout au long de cette aventure. Avec tout mon amour, merci à vous tous.

Un merci spécial à mes amis, mon groupe universitaire, dont la solidarité persiste à travers les années : Sally, Itlizée, Caroline, Nadia, Pégolène, Romain. À mon meilleur ami, qui est comme un frère pour moi, Simon. Et un grand merci également à mes amis et collègues rencontrés dans le monde professionnel : Edwinna, Anne-Sophie, Florence, Vincent, Coumba, Barbara, Olivier, Nunzio et Malik. Votre amitié a apporté de la lumière et de la chaleur à chaque étape de cette aventure, et je suis reconnaissante de pouvoir compter sur vous.

Un merci tout spécial à mon amoureux, Ayoub. Ta présence et ton soutien inconditionnel ont été la source de ma force et de ma motivation tout au long de cette aventure. Merci d'avoir partagé chaque moment, chaque défi et chaque victoire avec moi. Ton amour a été un phare qui a éclairé mon chemin, et je suis infiniment reconnaissante de t'avoir à mes côtés.

Avec une profonde gratitude, MERCI à tous. Ensemble, nous avons franchi des étapes significatives, et c'est avec humilité et reconnaissance que je clôture ce chapitre de ma vie académique. Merci infiniment pour avoir rendu cette réalisation possible.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du Fonds de la Recherche Scientifique F.R.S.-FNRS (bourse Télévie), du Fonds Léon Frédéricq (subsides de fonctionnement), de la Fondation Belge contre le Cancer, ainsi que de mes institutions d'accueil l'ULiège et le CHU de Liège.

Table des matières

INTRODUCTION	25
1. ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	25
1.1 GÉNÉRALITÉS	25
1.2 RECONSTITUTION IMMUNITAIRE	30
1.2.1 RECONSTITUTION DE L'IMMUNITÉ INNÉE	32
1.2.2 RECONSTITUTION DE L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE	35
1.2.2.1 LES LYMPHOCYTES T	37
1.2.2.1.1 INTERVENTION DE L'IL15 DANS LA PHASE THYMO-INDÉPENDANTE	59
1.2.2.2 LES LYMPHOCYTES B	60
2. LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HÔTE (GVHD)	61
2.1 LA MALADIE DU GREFFON CONTRE L'HÔTE AIGUË	62
2.1.1 PHASE 1 : DOMMAGES TISSULAIRES ET ACTIVATION DES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNE	66
2.1.2 PHASE 2 : ACTIVATION ET PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES T	71
2.1.3 PHASE 3 : MIGRATION ET EFFETS	74
2.2 PRÉVENTION	76
3. TRAITEMENTS DE LA GVHD	77
3.1 LES TRAITEMENTS STANDARDS	78
3.2 LES INHIBITEURS JANUS KINASES (JAKs)	78
3.2.1 LA VOIE DE SIGNALISATION JAK-STAT	79
3.2.2 LES INHIBITEURS JAK	84
4. L'EFFET GREFFE CONTRE LA TUMEUR (GVT)	95
5. RÔLE DE L'INTERLEUKINE-15	102
5.1 EFFET DE L'IL-15 SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	105
5.2 EFFET DE L'IL-15 EN POST-GREFFE	108
6. MODÈLES MURINS HUMANISÉS DE GVHD	113
6.1 LES SOURIS NSG	120
6.2 LES SOURIS NSG-IL15	124
6.3 LES SOURIS NSG-HLA-A2/HHO	126
6.4 LIMITATIONS DES MODÈLES MURINS HUMANISÉS	127
OBJECTIFS	131
RÉSULTATS	135

RÉSULTATS – PARTIE 1 : ETUDE DE L'ITACITINIB	137
RÉSULTATS – PARTIE 2 : ETUDE COMPARATIVE DE LA PRISE DE GREFFE ET DE LA PATHOGENÈSE DE LA GVHD ENTRE LES SOURIS NSG ET LES SOURIS NSG-IL15.	159
CONCLUSIONS	187
PERSPECTIVES	197
	199
PARTIE 3 : ETUDE COMPARATIVE DE LA PRISE DE GREFFE, DE LA PATHOGENÈSE DE LA GVHD ET DE L'EFFET GVT ENTRE LES SOURIS B-NDG ET LES SOURIS B-NDG HIL15.	199
PARTIE 4 – INHIBITION DE L'EXPRESSION DU GÈNE IL2RA (CD25) SUR LES LYMPHOCYTES T CD8+ PAR LA TECHNIQUE DE CRISPR-CAS9	205
BIBLIOGRAPHIE	217
ANNEXES	243

Liste des abréviations

ADP : adénosine monophosphate

Ag : antigène

Allo-HSCT : transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques

ATG : globuline anti-thymocytaire

BcL6 : B-cell lymphoma 6

BCR : récepteurs des lymphocytes B

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

CCR9 : récepteur de chimiokine C-C de type 9

CD62L : L-sélectine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CT-RCC : cellules d'un type spécifique d'un carcinome rénal

CTLA-4 : antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques-4

CyA : cyclosporine

CyA : cyclosporine

DAMPs : motifs associés aux dommages

DLI : donor lymphocyte infusion (perfusion de lymphocytes du donneur)

DP : thymocyte double positif

EBV : virus d'Epstein-Barr

EMBT : société européenne de transplantation de sang et de moelle

EPO : érythropoïétine

FDA : Administration des aliments et des médicaments des États-Unis

FICZ : 6-formylindolo[3,2-B] carbazole

G-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes

GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GVHD : maladie du greffon contre l'hôte

GvL : greffon contre la leucémie

GvT : greffon contre la tumeur

HERV-E : rétrovirus endogène humain

HLA : antigènes leucocytaires humains

HMGB-1 : protéine de la boîte 1 à haute mobilité

HSCT : transplantation de cellules souches hématopoïétiques

HSP : protéines de choc thermique

IFN- γ : interféron- γ

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IL-15 : interleukine-15

IL-2R γ c : chaîne γ commune du récepteur de l'IL-2

IL2R : récepteur de l'IL-2

IRF1 : facteur régulateur de l'interféron 1

JAK : Janus Kinase

KIR : récepteur de type immunoglobuline des cellules NK

LMA : leucémie myéloïde aiguë

MA : régime myéloablatif

mHA : antigènes mineurs d'histocompatibilité

MMF : mycophénolate mofétil

MTX : méthotrexate

MyD88 : protéine cytoplasmique de réponse primaire à la différenciation myéloïde 88

NK : Natural Killer

NMA : régime non myéloablatif

NOD : non obèse diabétique

NOD : non obèse diabétique

NOD : récepteurs cytosoliques de type NLR

ORR : objectif de réponse globale

P2X7R : récepteurs purinergiques

PAMPs : motifs associés aux dangers pathogènes

PBMCs : cellules mononucléaires du sang périphérique

PD-1 : protéine de la mort cellulaire programmée 1

pDCCDP : cellules dendritiques plasmacytoïdes

Prkdc : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

PRR : récepteur de reconnaissance de motifs

PSGL1 : ligand de P-sélectine

pSTAT : STAT phosphorylées

PTCy : cyclophosphamide

RAG1 : recombinaison activating gene

RIC : régime à intensité réduite

RMB-1 : leucémie érythroïde de la souris

RNS : espèce réactive de l'azote

ROS : espèce réactive de l'oxygène

RS-GVHD : GVHD réfractaire aux corticostéroïdes

SCID : immunodéficiences combinées sévères

SP : thymocyte simple positif

STAT : protéines de transduction du signal et activateurs de la transcription

Tac : tacrolimus

TCM : lymphocytes T mémoires centraux

TCR : récepteur des cellules T

Teff : lymphocytes T effecteurs

TEM : lymphocytes T mémoires effecteurs

TEMRA : lymphocytes T mémoires effecteurs terminaux

Tfh : lymphocyte T auxiliaire folliculaire

TGF- β : facteur de croissance transformant

TIGIT : récepteur immunitaire des lymphocytes T avec des domaines Ig et ITIM

TIM-3 : immunoglobuline des cellules T et protéine mucine 3 LAG-3 : lymphocyte activation gene-3

TLR : récepteur membranaire Toll-like

TNF- α : facteur de nécrose tumorale

TPO : thyroperoxydase

Treg : lymphocyte T régulateur

TRM : cellule T mémoire résidente dans les tissus

TSCM : cellules mémoires souches

TYK2 : protéine tyrosine kinase non réceptrice

WT1 : oncoprotéine de la tumeur de Wilms

Introduction

Introduction

1. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

1.1 Généralités

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une option thérapeutique potentiellement curative pour de nombreux patients atteints d'hémopathies malignes ou de certaines anomalies congénitales ou acquises de l'hématopoïèse (Hannon *et al.*, 2014). Dans les années 1950, lors d'expériences sur des souris, une découverte a été faite concernant la sensibilité de la moelle osseuse aux radiations ce qui a permis de comprendre que des CSH peuvent être transplantées après une irradiation sub-létale et assurer une récupération de l'hématopoïèse (Little and Storb, 2002). Cette découverte a conduit le médecin américain Edward Donnall Thomas à réaliser la première greffe de CSH en 1957 à l'Hôpital Mary Imogene Bassett (Cooperstown, état de New-York), chez un patient atteint d'une leucémie en utilisant de fortes doses d'irradiation corporelle totale suivies d'une greffe de CSH prélevées, au préalable, chez le jumeau du patient (donneur) dans le but d'éliminer le cancer. Bien que la greffe permette une récupération de l'hématopoïèse, le patient est malheureusement décédé plus tard des suites d'une récurrence de sa leucémie (Storb, 2012).

C'est en 1968 que des études dans des modèles canins ont permis de mettre en évidence l'importance de la compatibilité des antigènes leucocytaires entre le donneur et le receveur dans le cadre de la

transplantation de CSH (Epstein *et al.*, 1968; Storb *et al.*, 1968). Et c'est en 1980 que Jean Dausset a reçu le prix Nobel de Médecine pour sa découverte des antigènes leucocytaires humains (HLA) ce qui a d'ailleurs révolutionné notre compréhension au sujet de la compatibilité immunologique (Degos, 2009). Au fil des décennies, des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine de la greffe de CSH, en particulier, avec l'utilisation de la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur. En effet, depuis 1957, grâce au travail novateur du Dr Thomas et de son équipe dans le domaine de la transplantation de CSH, des avancées majeures ont été réalisées dans le cadre du traitement des maladies hématologiques ainsi que dans la compréhension du rôle du système immunitaire lors de cette thérapie, faisant ainsi de la greffe de CSH une modalité thérapeutique vitale pour de nombreuses maladies hématologiques (Ringdén, 2007; Arrighi, 2018). Le Dr Thomas a d'ailleurs également reçu, en 1990, le prix Nobel de médecine pour le développement de la transplantation de CSH.

A l'heure actuelle, probablement plus d'un million d'allogreffes de CSH ont été réalisées à travers le monde (Niederwieser *et al.*, 2022). C'est d'ailleurs la société européenne de transplantation de sang et de moelle (EBMT) qui a lancé une enquête en 1990 pour suivre l'activité des centres de transplantation de CSH en Europe et cette enquête est mise à jour annuellement depuis lors. L'analyse de ces données a révélé une croissance constante du nombre annuel de greffes et des taux de transplantation jusqu'en 2020, année où une baisse d'activité a été observée pour la première fois,

probablement en raison de la pandémie du SARS-CoV-2. Cette perturbation a engendré un retard notable dans l'activité de transplantation, se traduisant par une reprise partielle en 2021, mais avec un impact significatif persistant, retardant le processus de 2 à 3 ans selon les résultats de l'enquête (EBMT, 2019).

Le processus de transplantation de CSH se divise en trois étapes majeures (Figure 1) :

La première étape de la transplantation de CSH est cruciale et implique l'administration d'un conditionnement, effectué une semaine ou dix jours avant la transplantation, visant à préparer le patient à la greffe. Les objectifs de ces conditionnements sont multiples : réduire les cellules tumorales, libérer des espaces dans la moelle osseuse pour faciliter l'implantation des cellules souches hématopoïétiques du donneur, et atténuer le système immunitaire du patient afin d'éviter le rejet du greffon. Aujourd'hui, trois approches principales sont utilisées avant une transplantation allogénique :

- Les régimes de conditionnement myéloablatifs (MA ; c'est-à-dire entraînant une aplasie médullaire irréversible en l'absence de greffe de cellules souches) reposent sur l'utilisation de chimiothérapie à haute dose seule ou combinée à une irradiation corporelle totale. Les doses élevées visent à éliminer les cellules leucémiques résiduelles, persistant même après une rémission complète obtenue par des traitements conventionnels. En utilisant des doses 5 à 10 fois supérieures à celles tolérées en chimiothérapie classique, les conditionnements MA visent à

maximiser la toxicité hématologique. Ils entraînent cependant souvent des toxicités sévères dans les autres organes.

- Les régimes de conditionnement à intensité réduite (RIC) qui provoquent une aplasie médullaire réversible.
- Les régimes de conditionnement non-MA (NMA) qui provoquent une aplasie médullaire minimale.

Au cours des 25 dernières années, des avancées significatives ont été réalisées, passant des régimes MA à très fortes doses aux conditionnements RIC et NMA parfois qualifiés de "mini-greffes" élargissant ainsi les opportunités d'allogreffe de CSH pour le traitement des patients âgés ainsi que ceux présentant des comorbidités. Le conditionnement RIC a d'ailleurs été utilisé pour 40% de toutes les transplantations allogéniques de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT) et cette tendance continue d'augmenter (Resnick, Shapira and Slavin, 2005; Giralt and Bishop, 2009; Atilla, Atilla and Demirer, 2017).

La seconde phase de l'allogreffe implique l'administration d'un greffon allogénique, contenant des CSH et des lymphocytes T. Ces derniers jouent un rôle multifonctionnel : ils contribuent à la reconstitution immunitaire, exerçant un effet greffe contre la tumeur (GvT), mais peuvent également déclencher la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

Enfin, la troisième phase, la période de récupération de l'hématopoïèse, commence dès la greffe. À partir des cellules souches, le processus de reconstitution du sang (comprenant les neutrophiles, les plaquettes et les globules rouges) se met en place et s'étale sur une période de 2 à 4 semaines. La récupération des

neutrophiles est la plus rapide, suivie des plaquettes et des globules rouges. La vitesse de récupération varie notamment selon le type de greffon, le nombre de CSH greffées, et le type de prophylaxie de la GVHD utilisé (Tecchio and Cassatella, 2021).

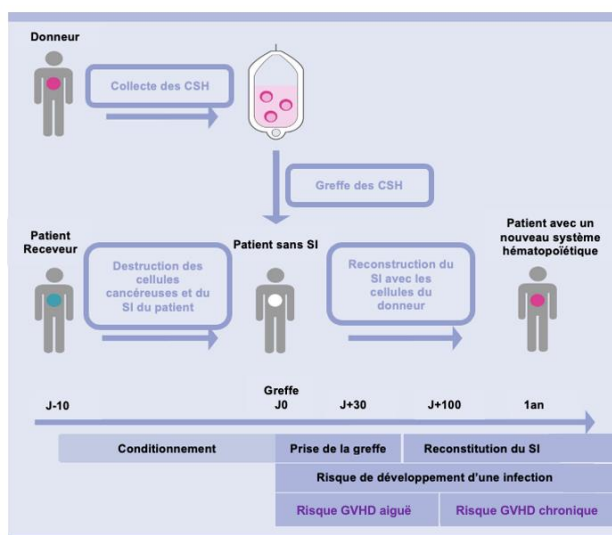


Figure 1. Description des étapes de l'allogreffe. Le conditionnement détruit les cellules cancéreuses ainsi que le système immunitaire du receveur afin d'éviter tout rejet de greffe. Les cellules transplantées chez le receveur permettent de reconstruire le SI de celui-ci, ce qui peut prendre plusieurs mois voir années exposant ainsi le patient à de potentielles infections sévères. Durant la phase de prise de greffe et de reconstitution du SI, le patient peut également développer une GVHD aiguë ou une GVHD chronique. (Figure adaptée provenant du site <https://www.miltenyibiotec.com/DK-en/products/cell-therapy/clinimacs-cd34-reagent-system-fda-approved/Patients/what-is-allogeneic-stem-cell-transplantation.html>).

Trois sources principales de cellules souches sont exploitées : la moelle osseuse, le sang de cordon et le sang périphérique. Le prélèvement dans la moelle osseuse nécessite une ponction sous anesthésie générale tandis que les CSH présentes dans le sang périphérique après administration du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) sont collectées par apherèse,

simplifiant ainsi la procédure. Le sang de cordon, prélevé à la naissance et typé HLA, est congelé et conservé pour un usage futur (Koestenbauer *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, lors d'une allogreffe, le sang périphérique est souvent privilégié comme source de CSH, car elle permet une récupération hématologique plus rapide (Figure 2).

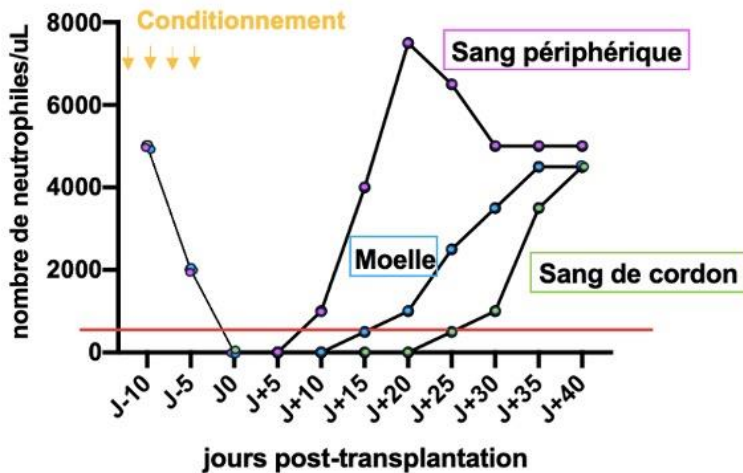


Figure 2. Récupération hématologique en fonction de la source de CSH. Les CSH collectées dans le sang périphérique après mobilisation par le G-CSF sont le plus souvent privilégiées comme source de CSH car elles permettent une récupération hématologique plus rapide, ce qui réduit ainsi la période critique d'aplasie médullaire. De plus, leur utilisation diminue le risque et la pénibilité pour le donneur. En dessous de la ligne rouge, le receveur est en neutropénie sévère et donc, à risque de contracter une infection. (Figure adaptée du cours du Prof. Beguin sur le greffe, syllabus 2015).

1.2 Reconstitution immunitaire

La phase de reconstitution immunitaire qui suit une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est essentielle pour le rétablissement complet du système immunitaire du patient. Cette période se divise en deux volets essentiels : la reconstitution

immunitaire innée, marquée par la récupération rapide des cellules telles que les neutrophiles, les monocytes et les cellules NK, et la reconstitution immunitaire adaptative, impliquant le rétablissement progressif des lymphocytes T et B (Figure 3). Cette dualité joue un rôle essentiel dans la restauration d'un système immunitaire fonctionnel, indispensable pour combattre les infections, éliminer les cellules cancéreuses résiduelles, et assurer le succès global de l'allogreffe.

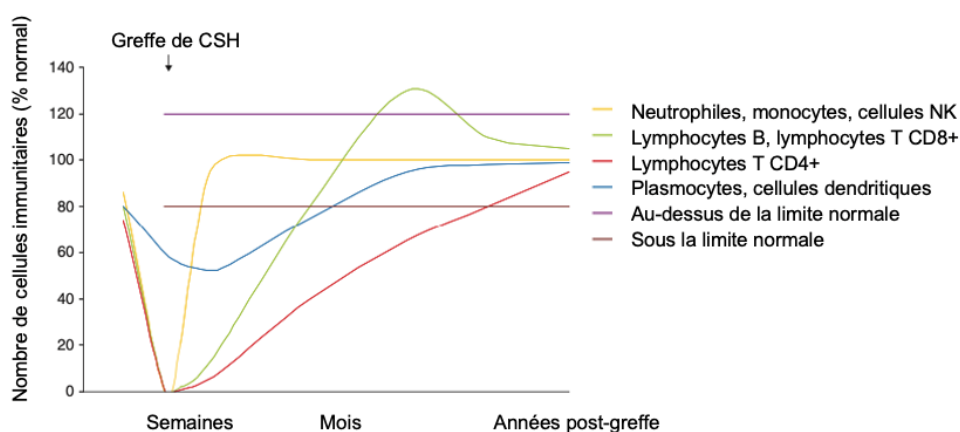


Figure 3. Reconstitution immunitaire après une allogreffe de CSH. Les populations de cellules immunitaires se rétablissent avec des cinétiques différentes en fonction de plusieurs facteurs. Au moment de la transplantation, certaines cellules présentent une certaine résistance au régime de conditionnement telles que les plasmocytes et les cellules dendritiques (ligne bleue) tandis que les cellules immunitaires innées, les lymphocytes B et les lymphocytes T chutent de manière drastique. Après la greffe, les cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles, les monocytes et les cellules NK (ligne jaune) se rétablissent rapidement. Leur récupération est influencée par le type de greffon (plus rapide avec des cellules souches provenant du sang périphérique, intermédiaire avec la moelle osseuse et plus lente avec le sang de cordon). Elles sont suivies par les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes B (ligne verte) qui peuvent atteindre temporairement des niveaux supranormaux. La récupération des lymphocytes B est retardée par la GVHD et son traitement. Enfin, les lymphocytes T CD4+ (ligne rouge) se rétablissent lentement pour atteindre des taux normaux plusieurs années après la greffe. C'est

particulièrement le cas pour les lymphocytes T CD4+ naïfs. La récupération des lymphocytes T CD4+ est influencée par le contenu en lymphocytes T du greffon, par l'âge du patient au moment de la transplantation (plus rapide chez les enfants que chez les adultes) et par la survenue ou non d'une GVHD. Figure adaptée de (Storek, 2008).

1.2.1 Reconstitution de l'immunité innée

En 1774, l'anatomiste William Hunter a été le premier à repérer les leucocytes sur un site inflammatoire (Silverstein, 1979). En 1884, Elie Metchnikoff fut le premier à avancer la notion de théorie cellulaire de l'immunité ce qui s'est avéré être le point de départ de l'analyse fonctionnelle des cellules immunitaires innées (Metschnikoff, 1884). En 1890, Jean Massart et Charles Bordet ont démontré que les cellules lésées libéraient des substances chimiques qui attiraient les phagocytes par le phénomène de chimiotactisme (Massart J., 1891).

Notre compréhension de l'immunité est donc basée sur les premières observations des cellules immunitaires innées, et c'est cette compréhension historique qui est essentielle pour comprendre comment ces cellules interviennent dans la reconstitution immunitaire après une greffe de CSH. Dès lors, la reconstitution des cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK après une greffe de CSH est un processus complexe et crucial pour le rétablissement du système immunitaire du patient.

Suite au conditionnement MA, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages subissent une ablation mais leurs taux sanguins se

rétablissent rapidement après l'allogreffe et reviennent à des niveaux normaux un à deux mois après la transplantation de CSH. En effet, les cellules immunitaires innées telles que les neutrophiles et les cellules NK sont les premières à être rétablies. Les cellules NK ont été découvertes dans les années 1970 et sont appelées "Natural Killer" en raison de leur capacité à tuer les cellules cibles, notamment les cellules infectées par des virus ou les cellules cancéreuses, sans nécessiter une activation préalable. Elles constituent donc la première ligne de défense contre les infections. Il est particulièrement important de noter que la récupération des cellules NK joue un rôle crucial dans le cadre d'une allogreffe avec élimination des lymphocytes T. En effet, ces cellules éliminent à la fois les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur, ce qui réduit ainsi le risque de développer une GVHD, et les cellules leucémiques résiduelles de l'hôte. De fait, les cellules NK ont la capacité de cibler et de détruire les cellules dendritiques et les CPA activées, qui sont nécessaires pour l'activation des lymphocytes T. Cette élimination des CPA contribue à diminuer l'activation excessive des lymphocytes T, réduisant ainsi l'incidence et la sévérité de la GVHD. De plus, les cellules NK exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules leucémiques résiduelles, contribuant à l'effet greffe contre la leucémie (GvL). Une étude menée par L. Ruggeri et ses collaborateurs a démontré que les cellules NK allogéniques pouvaient détruire les cellules leucémiques sans causer de GVHD, ce qui est primordial pour améliorer les résultats post-transplantation (Ruggeri *et al.*, 2002). Par ailleurs, les scientifiques G. Ferlazzo et C. Munz ont montré que les interactions

entre les cellules NK et les cellules dendritiques sont essentielles pour moduler la réponse immunitaire. En effet, les cellules NK sont capable d'éliminer les cellules dendritiques immatures et ainsi, in fine, réguler l'activation des lymphocytes T (Ferlazzo and Münz, 2004). Leur rôle dans la défense innée contre les infections et les tumeurs est donc bien établi (Dulphy *et al.*, 2009). Les niveaux des cellules NK reviennent à la normale environ un mois après une allogreffe (Boyiadzis *et al.*, 2008). Quant aux neutrophiles, ils sont essentiels pour combattre les bactéries et les champignons (Ogonek *et al.*, 2016).

Concernant les cellules dendritiques, en particulier les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), elles sont déficientes pendant 6 à 18 mois après une allogreffe. Récemment, les pDC ont été suggérées comme étant responsables d'un effet anti-GVHD, car une corrélation a été établie entre des niveaux élevés de pDC après la transplantation et une réduction de l'incidence de développer une GVHD. Malheureusement, un grand nombre de pDC peut également inhiber l'effet GvT. Les cellules dendritiques du receveur présentent des allo-antigènes (provenant de leurs propres cellules) aux lymphocytes T du donneur. Cette présentation d'antigène active les lymphocytes T du donneur, les incitant à attaquer les cellules du receveur ce qui déclenche in fine la GVHD (Bosch, Khan and Storek, 2012).

1.2.2 Reconstitution de l'immunité adaptative

L'immunité acquise se caractérise par quatre propriétés fondamentales : la diversité, la spécificité, la mémoire et la tolérance envers le soi. Les lymphocytes B et T réagissent de manière spécifique à un antigène donné, tout en conservant la capacité de reconnaître un grand éventail d'antigènes grâce au fait qu'il y a un vaste répertoire de lymphocytes avec un récepteur à l'antigène différent, et de se souvenir des caractéristiques des antigènes précédemment rencontrés. En outre, sauf dans des situations pathologiques telles que les maladies auto-immunes, les lymphocytes T et B ne sont pas activés par les antigènes du soi, ce qui témoigne d'une tolérance envers les composants du corps.

Les lymphocytes B, issus de la moelle osseuse, sont responsables de l'immunité humorale et produisent des Ig. L'immunité cellulaire, quant à elle, est assurée par les lymphocytes T, qui se développent dans le thymus à partir de précurseurs T provenant de la moelle osseuse. Une coopération étroite existe entre les réponses humorale et cellulaire, car l'aide des cellules T est nécessaire à l'activité des cellules B, tandis que les lymphocytes B sont capables de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

La reconstitution immunitaire adaptative après une greffe de CSH est donc un processus complexe qui peut s'étaler sur une période prolongée. Les lymphocytes T et B subissent une perturbation significative lors de la transplantation, car le traitement de conditionnement préalable à la greffe élimine les cellules

immunitaires du patient. Par conséquent, la reconstitution de ces cellules est essentielle pour restaurer la capacité du système immunitaire à répondre spécifiquement aux infections. Cette reconstitution peut varier en fonction de plusieurs facteurs, notamment le type de greffe, la source des cellules souches, le schéma thérapeutique, ainsi que la préservation de la fonction thymique. Cette dernière est particulièrement importante car elle permet la maturation des lymphocytes T, essentiels pour la reconnaissance spécifique des antigènes et la mémoire immunitaire. La reconstitution immunitaire post-greffe peut prendre plusieurs mois, voire des années, pour atteindre à nouveau un niveau de normalité.

Pendant cette période, les patients sont donc souvent vulnérables aux infections, ce qui nécessite une surveillance étroite et des mesures de prophylaxie. Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la GVHD et la prévention de cette complication grave est donc un défi important dans la prise en charge des patients après une greffe de CSH. La compréhension approfondie de la reconstitution immunitaire adaptative avec un compartiment de lymphocytes T efficaces semble donc primordiale pour améliorer les stratégies de traitement, minimiser les risques associés à la greffe et, in fine, assurer le succès de l'allogreffe de CSH (Bosch, Khan and Storek, 2012; Toubert *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Les lymphocytes T

La reconstitution immunitaire des lymphocytes T après une greffe de CSH implique deux voies distinctes : la voie thymo-dépendante et la voie thymo-indépendante (Figure 4).

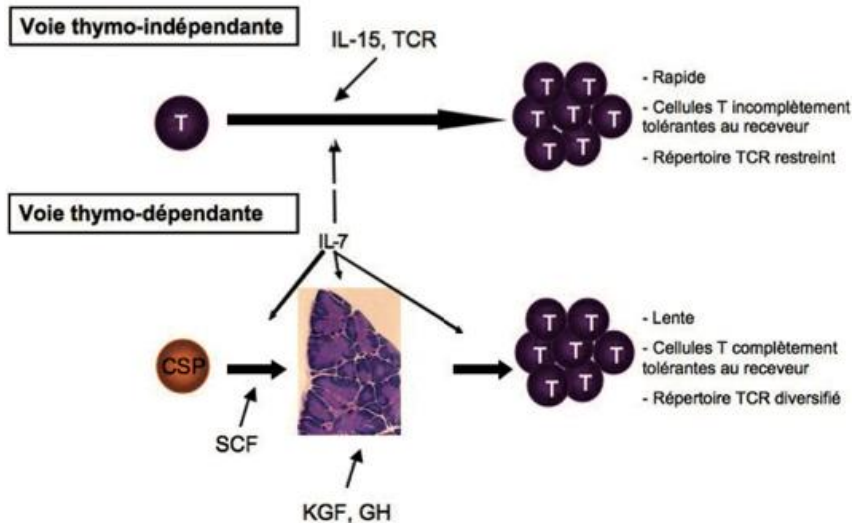


Figure 4. Voie thymo-indépendante et thymo-dépendante de la reconstitution des lymphocytes T après une HSCT. La voie thymo-indépendante assure la reconstitution immunitaire à court terme et l'effet GvT mais est responsable de la GVHD. La voie thymo-dépendante assure la reconstitution immunitaire à long terme. CSP : cellules souches pluripotentes, SCF : facteur de croissance des cellules souches, KGF : facteur de croissance des kératinocytes, GH : hormone de croissance. Figure venant de (Castermans *et al.*, 2009).

La voie thymo-indépendante implique la prolifération et l'activation des lymphocytes T matures présents dans le greffon qui seront stimulés par des cytokines inflammatoires comme l'IL-7 ou l'IL-15, ou des antigènes microbiens persistants. L'IL-7, principalement produite par les cellules stromales dans la moelle osseuse et le thymus, joue un rôle important dans la survie et la prolifération des lymphocytes T matures dans les tissus lymphoïdes périphériques. Elle est essentielle pour maintenir l'homéostasie des lymphocytes

et soutenir la voie thymo-dépendante dans le cadre de la reconstitution des lymphocytes T (Griesemer, Sorenson and Hardy, 2010). D'autre part, l'IL-15 est produite par divers types de cellules, y compris les cellules stromales et les CPA. Cette cytokine est essentielle pour la survie des lymphocytes T mémoires et des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ainsi que pour favoriser la différenciation des lymphocytes T effecteurs, renforçant ainsi la réponse immunitaire à court terme contre les infections virales et les cellules tumorales (Castermans *et al.*, 2009).

Cette voie thymo-indépendante constitue la principale source de lymphocytes T au cours des premiers mois post-greffe chez les jeunes patients ayant subi une HSCT et la seule source chez les patients âgés allogreffés. Elle est généralement plus efficace dans la reconstitution des lymphocytes T CD8+ par rapport aux lymphocytes T CD4+ après une HSCT. Le défaut de cette voie, c'est qu'elle génère des lymphocytes T de spécificité relativement restreinte, étant donné que les lymphocytes T créés le sont à partir d'un nombre de clones limité. Néanmoins, les lymphocytes T, proliférant de cette voie thymo-indépendante, sont les principaux effecteurs de la GVHD et de l'effet GvT (Castermans *et al.*, 2009).

Quant à la voie thymo-dépendante, elle prend le relais environ 3 à 6 mois après la greffe chez les jeunes patients. Cette voie est plus rapide chez les jeunes en raison de l'atrophie thymique liée à l'âge. Elle assure la création de millions de lymphocytes T de spécificités différentes par recombinaison somatique, ce qui garantit ainsi la

diversité des clones T en périphérie, qui sont tolérants envers les cellules du receveur. La voie thymo-dépendante est responsable de la régénération des lymphocytes T matures fonctionnels. En effet, les CSH et les précurseurs lymphoïdes du donneur vont coloniser la moelle du receveur et donner naissance à des pré-lymphocytes T, qui vont ensuite, migrer vers le thymus où ils vont se différencier sous l'influence de signaux thymiques donnant ainsi naissance à des lymphocytes T matures. Ces derniers vont migrer vers les tissus lymphoïdes périphériques pour contribuer à la réponse immunitaire adaptative (Castermans *et al.*, 2009).

Parmi les lymphocytes T, deux sous-populations principales se distinguent : les lymphocytes T CD4+ auxiliaires et les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Ces sous-populations jouent des rôles spécifiques dans la réponse immunitaire, les CD4+ aident à coordonner la réponse tandis que les CD8+ sont responsables de la cytotoxicité contre les cellules infectées ou tumorales.

Concernant leur développement, les lymphocytes T se forment principalement dans le thymus, site primaire où ils subissent leur maturation cellulaire essentielle. C'est là que les progéniteurs de la moelle osseuse subissent des réarrangement au niveau des gènes qui encodent les différentes chaînes du récepteur des cellules T (TCR) à leur surface, leur permettant de reconnaître spécifiquement les antigènes. Ce processus génère des thymocytes double positifs (DP) CD4+CD8+. Les cellules DP subissent une sélection donnant naissance à des thymocytes simples positifs (SP) CD4+ ou CD8+ qui émergent finalement dans la périphérie sous forme de cellules T

matures naïves présentant un phénotype CD45RA+CCR7+ (Griesemer, Sorenson and Hardy, 2010).

Les lymphocytes T CD4+ auxiliaires sont essentiels pour coordonner la réponse immunitaire en stimulant d'autres cellules immunitaires, telles que les lymphocytes B et les macrophages. Les lymphocytes T CD4+, selon le contexte cytokinique environnant, se différencient en sous-populations telles que les Th1, les Th2, les Th9, les Th17, les Th22, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh), qui se caractérisent par l'expression de profils cytokiniques différents (Figure 5).

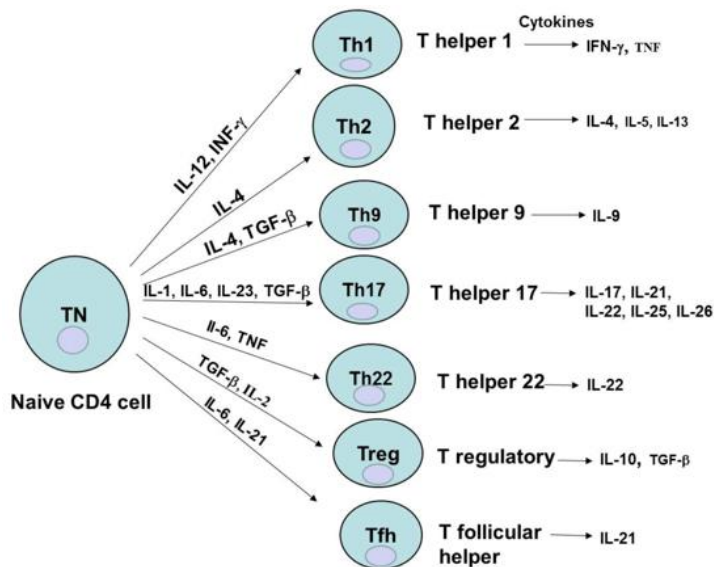


Figure 5. Les sous-populations de lymphocytes T CD4+. Celles-ci se différencient à partir des lymphocytes T CD4+ naïfs sous l'influence de différentes cytokines. Chaque sous-population de lymphocytes T CD4+ possède un profil cytokinique spécifique. Par exemple, les cellules Th1 libèrent de l'IFN- γ et du TNF, tandis que les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4 qui est un facteur de survie pour les lymphocytes B mais également de l'IL-5 et de l'IL-13. Les cellules Th9 produisent de l'IL-9. Les Tregs, eux, sécrètent de l'IL-10 qui est une cytokine qui permet le

maintien de l'expression du facteur de transcription FOXP3, essentiel à la fonction suppressive des Tregs sur d'autres cellules ainsi que du TGF- β et de l'IL-35. Enfin, les cellules Th17 produisent de l'IL-17, une cytokine qui recrute les neutrophiles ayant un rôle majeur dans la défense de l'hôte contre les bactéries et les champignons. Figure venant de (Golubovskaya and Wu, 2016).

Ces différentes sous-populations de lymphocytes T CD4+ jouent un rôle spécifique dans les fonctions immunitaires et effectrices des lymphocytes T. Chacune de ces populations se différencie à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs en réponse à des cytokines spécifiques et est influencée par le type de stimulation, par la concentration et l'affinité pour l'antigène et par les signaux de co-stimulation (Wu, Anasetti and Yu, 2019; Jiang *et al.*, 2021). Néanmoins, notons également que des signaux de régulation négative peuvent empêcher l'activation des lymphocytes T en induisant une anergie des lymphocytes T. Ces signaux de co-inhibition incluent le CTLA-4 (antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques-4), le PD-1 (protéine de la mort cellulaire programmée 1), le TIM-3 (immunoglobuline des cellules T et protéine mucine 3) et le LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) exprimés par les lymphocytes T qui interagissent respectivement avec les membres de la famille B7, le PD-L1 ou le PD-L2, la galectine-9 et le CMH-II (Figure 6) (Wu, Anasetti and Yu, 2019).

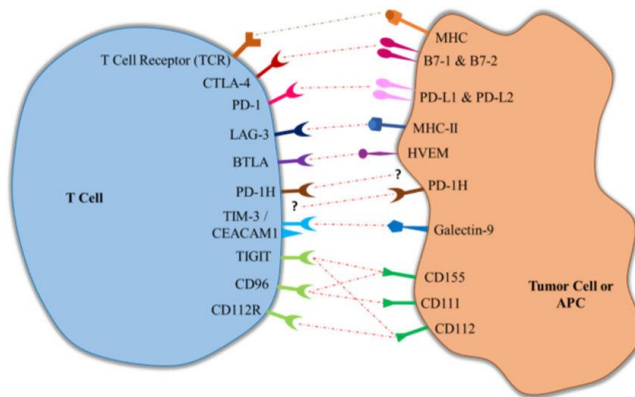


Figure 6. Interaction entre les récepteurs de régulation immunitaire et leurs ligands respectifs jouant un rôle dans la régulation des réponses immunitaires. Ces interactions modulent les réponses immunitaires et sont donc des cibles importantes dans le cadre des immunothérapies, notamment dans le cadre de la GVHD. Figure venant de (Torphy, Schulick and Zhu, 2017).

Les cellules Th1 se forment en réponse à l'IL-12 et à l'IFN- γ , des cytokines pro-inflammatoires qui augmentent l'expression des récepteurs Toll-like (TLR) et induisent la sécrétion de cytokines. L'activation du récepteur à l'IFN- γ entraîne la phosphorylation du facteur de transcription STAT1, conduisant à une augmentation rapide de l'expression du facteur de transcription T-bet, qui favorise l'expression du récepteur à l'IL-12. Les Th1 deviennent ainsi sensibles à l'IL-12, stimulant davantage l'expression de T-bet ainsi que la sécrétion d'IFN- γ . Celui-ci est produit principalement par les cellules Th1 en réponse à l'activation de leurs TLR et d'autres récepteurs de l'immunité innée lors d'infections virales, bactériennes, etc. De manière similaire, les macrophages produisent l'IL-12 en réponse à ces stimuli, ce qui renforce la différenciation vers les cellules Th1 qui à leur tour, produisent de l'IFN- γ de façon massive, amplifiant ainsi l'activation des macrophages et favorisant l'inflammation immunitaire. En effet, les

Th1 sécrètent de l'IL-2 et de l'IFN- γ . Dans le cadre de la GVHD, cette polarisation des lymphocytes T vers la voie Th1, sous l'influence de T-bet et de l'IL-12, amplifie la réponse immunitaire et contribue au développement de la GVHD (Fowler and Gress, 2000; Fowler, 2019). Néanmoins, il a été rapporté que l'IFN- γ protégeait contre le développement précoce de la GVHD après la HSCT mais l'aggravait à des moments ultérieurs (Fu *et al.*, 2015).

Les cellules Th2, quant à elles, émergent en réponse à l'IL-4. L'activation de son récepteur présent sur les lymphocytes T CD4+ naïfs va engendrer l'activation de STAT5 qui, à son tour, coopère avec le facteur de transcription GATA-3 pour promouvoir la sécrétion d'IL-4 et favoriser ainsi la polarisation Th2. GATA-3 et STAT5 ont pour rôle de réguler à la hausse le récepteur T1/ST2 qui transmet des signaux pour l'IL-33 qui est associée à la fonction de Th2 (Wei-ping and Flavell, 1997; Fowler, 2019). Les Th2 sécrètent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL13. Les Th2 présents dans le greffon du donneur n'initient pas de GVHD aiguë et peuvent réguler le développement de la GVHD médiée par les lymphocytes T alloréactifs sans entraver l'allogreffe, ils auraient donc un rôle protecteur (Fowler and Gress, 2000; Zeiser *et al.*, 2007). De plus les Th2 sont connus pour favoriser une réponse immunitaire orientée vers des réponses allergiques et la lutte contre les infections parasitaires.

Concernant, les Th17, ils nécessitent du TGF- β , de l'IL-6 et de l'IL-2 ce qui va entraîner l'expression du facteur de transcription ROR γ t

conduisant à leur différenciation (Ivanov *et al.*, 2006). Les Th17 sécrètent de l'IL-17A, de l'IL-17F, du TGF- β , de l'IL-21, de l'IL-22, de l'IL-23 et de l'IL-6 et sont connues pour induire la GVHD malgré que l'IL-17A soit connue pour son rôle protecteur dans la GVHD après une allo-transplantation (Wu and Yu, 2018).

Les Th9, quant à eux, expriment l'IL-1 β qui va induire la phosphorylation du facteur de transcription STAT1 ainsi que l'expression du gène IRF1 (facteur régulateur de l'interféron 1) qui, à son tour, va se lier aux promoteurs de l'IL-9 et de l'IL-21 afin d'augmenter la sécrétion de ces cytokines par les Th9. Ces cellules sont également connues pour leur fonction anti-cancéreuse de manière dépendante à l'expression d'IRF1 et de l'IL-21. IRF1 semble donc être une cible pour le contrôle de la fonction des Th9 (Végran *et al.*, 2014).

A propos des Th22, ceux-ci se différencient sous l'influence de l'IL-6, de l'IL-23, de l'IL-1 β et du 6-formylindolo[3,2-B] carbazole (FICZ). Elles expriment également le facteur de transcription ROR γ t et sécrètent de l'IL-22 et du TNF- α . Par contre, le facteur de transcription T-bet est un facteur de transcription inhibiteur pour les Th22. L'impact des cellules Th22 sur la GVHD aiguë reste débattu. En effet, d'une part, l'IL-22 a un effet protecteur connu sur les cellules souches intestinales ce qui rend cette cytokine importante pour l'intégrité de la barrière intestinale. Mais, d'autre part, l'injection exogène d'IL-22 après la greffe a démontré une augmentation de la

sévérité de la GVHD aiguë dans des modèles murins (Jiang *et al.*, 2021).

Les Tfh, CD4+CXCR5+, résident dans les organes lymphoïdes secondaires et sont essentiels pour réguler le développement progressif de l'immunité des lymphocytes B spécifiques de l'antigène *in vivo* et la génération d'anticorps (Fazilleau *et al.*, 2009). Ils se différencient en plusieurs étapes. A commencer par l'amorçage d'un lymphocyte T CD4+ naïf par une CD. A cette étape, l'IL-6 va permettre l'augmentation du facteur de transcription Bcl6 (B-cell lymphoma 6) dans la cellule en cours de maturation. In fine, les Tfh sécrètent de l'IL-21 qui est sa cytokine principale. Notons que l'IL-2 est un inhibiteur de la voie Tfh. Cependant les Tfh sont généralement moins pertinents dans le cadre de la GVHD aiguë (Hill and Koyama, 2020).

Concernant les Tregs, ils expriment les marqueurs extracellulaires CD4+CD25+ ainsi que le facteur de transcription FOXP3+, codé sur le chromosome X, dans leur cytosol (marqueur intracellulaire). Ils représentent une sous-population spécifique de lymphocytes T essentielle pour le maintien de l'homéostasie immunitaire (Hori, Nomura and Sakaguchi, 2003). Plus spécifiquement, ils représentent 9 à 10 % des thymocytes SP CD4+ humains (Watanabe *et al.*, 2005) et quittent le thymus avec un phénotype naïf CD45RA+CCR7+. Cependant, la fréquence des Tregs naïfs diminue avec l'âge, principalement en raison de l'involution

thymique (Seddiki *et al.*, 2006). Leur différenciation se fait en réponse à l'IL-2 et au TGF- β .

Il convient également de souligner qu'une partie des lymphocytes T à forte affinité pour le soi peut se différencier en Tregs dès leur développement dans le thymus. Cette différenciation permet aux Tregs de jouer un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire pour prévenir les réactions auto-immunes excessives dès leur activation. Après la stimulation du TCR, la protéine transmembranaire GARP, possédant un grand domaine extracellulaire contenant 20 répétitions riches en leucine, se lie et engendre l'expression de TGF- β 1 latent à la surface des Tregs. Néanmoins, GARP n'est pas suffisant pour induire la production active de TGF- β 1 (Gauthy *et al.*, 2013; Hannon *et al.*, 2014). Par contre, les Tregs expriment abondamment le récepteur de l'IL-2 (IL2R) de haute affinité α (CD25) $\beta\gamma$ et dépendent de l'IL-2 produite par les cellules T activées. Cette caractéristique basée sur leur consommation d'IL-2 indique un rôle clé concernant leur fonction de suppression immunitaire. C'est en effet grâce à des études génétiques que l'IL-2 a été identifiée comme étant principalement utilisée par les Tregs pour réguler les lymphocytes T CD8+ en plus de leur rôle dans le contrôle des lymphocytes T CD4+. L'activation de la voie de signalisation de STAT5 dépendante de l'IL2R est essentielle à la fonction suppressive des Tregs et ce, indépendamment des signaux provenant du récepteur d'antigène des lymphocytes T (Chinen *et al.*, 2016). En outre, les Tregs possèdent également une plasticité car ils peuvent se transformer en Th17 exprimant le ROR γ T après une activation de STAT3 induite

par la cytokine inflammatoire IL-6. Notons que la plasticité des lymphocytes T est particulièrement importante au niveau des Tregs/Th17 (Fowler, 2019).

D'ailleurs, il convient de noter que M. Miyara et ses collaborateurs ont subdivisé les Tregs en trois populations sur la base de leur expression de CD45RA ainsi que leur niveau d'expression de FOXP3 (Miyara *et al.*, 2009). Plus récemment, J. Hua et son équipe ont observé que les Tregs pouvaient être séparés en 16 sous-ensembles distincts sur base d'une analyse en cytométrie en flux et qu'ils pouvaient, ensuite, être classés en cinq sous-groupes génomiques différents (Hua *et al.*, 2015). De plus, V. Schiavon et son équipe ont démontré que les Tregs pouvaient également être subdivisés en cinq stades de maturation sur la base d'expression de CD45RA, CD26 et CD39 à la surface des cellules (Schiavon *et al.*, 2019). Ainsi, plus précisément, les Tregs naïfs sont définis comme étant CD45RA+CD26+CD39-, tandis que les Tregs mémoires sont divisés en quatre sous-types majeurs de maturation : M1 (RA-CD26+CD39-), M2 (RA-CD26-CD39-), M3 (RA-CD26+CD39+) et M4 (RA-CD26-CD39+) (Ritacco *et al.*, 2021). Il est important de souligner que la plupart des Tregs circulants (90-95%) sont des Tregs mémoires et que leurs niveaux sont maintenus tout au long de la vie (Booth *et al.*, 2010). Cette prédominance des Tregs mémoires dans la circulation suggère un rôle fonctionnel majeur dans le maintien de l'homéostasie immunitaire.

En effet, chez un individu en bonne santé, les Tregs exercent les fonctions suivantes (Figure 7) :

- Séquestration de l'IL-2 : les Tregs ont la capacité de capturer l'IL-2, une cytokine importante pour la survie et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Teff). En réduisant la disponibilité de l'IL-2, les Tregs limitent ainsi la prolifération des Teff et maintiennent, in fine, un équilibre immunitaire.
- Libération de substances régulatrices : les Tregs sécrètent des molécules telles que l'adénosine et l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) qui agissent pour moduler le métabolisme des Teff. Cette régulation métabolique contribue à supprimer l'activité des Teff et à maintenir l'homéostasie immunitaire.
- Induction de la mort des Teff : les Tregs sont capables d'induire l'apoptose des Teff en libérant des molécules cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes. Cette capacité contribue à supprimer les réponses immunitaires excessives et à maintenir la tolérance immunitaire.
- Blocage de l'activation des Teff : les Tregs expriment les molécules CTLA-4 de manière constitutive qui interagissent avec les molécules de co-stimulation B7 des CPAg matures ce qui les rend indisponibles pour activer les Teff. Ce mécanisme empêche l'activation des Teff et contribue à maintenir la tolérance immunitaire envers les antigènes du soi.
- Production de cytokines anti-inflammatoires : les Tregs produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35. Ces cytokines suppriment l'activité des Teff et favorisent un environnement immunitaire tolérant.

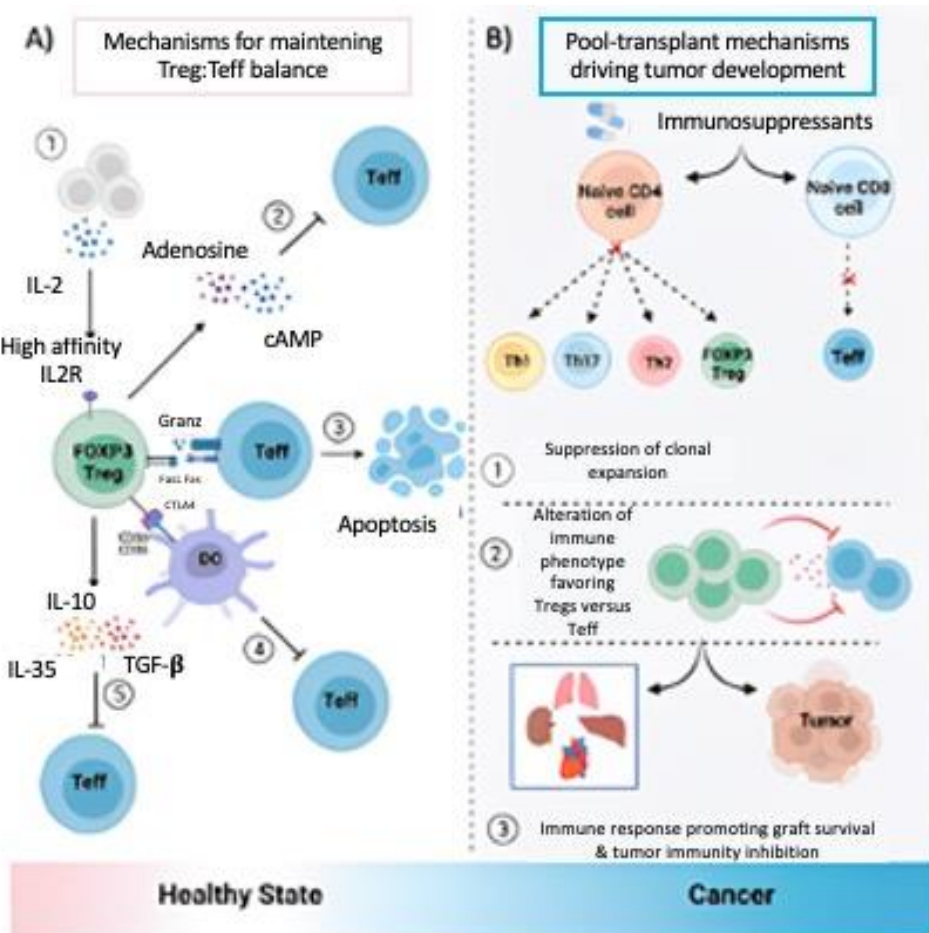


Figure 7. Homéostasie et dysrégulation des Tregs. **A)** Chez un individu en bonne santé, les Tregs ont la capacité de séquestrer l'IL-2, une molécule importante pour la survie des lymphocytes T effecteurs (Teff). De plus, les Tregs libèrent des substances comme l'adénosine et le cAMP qui modulent le métabolisme des Teff et qui contribuent à maintenir un équilibre immunitaire. Les Tregs peuvent également induire la mort des Teff et bloquer leur activation en interagissant avec les CPA. Enfin, les Tregs produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF-β et l'IL-35, qui inhibent l'activité des Teff. **B)** Chez un individu ayant un cancer et ayant subi un HSCT, certains immunosuppresseurs semblent favoriser l'expansion des Tregs par rapport aux Teff ce qui réduit le risque de réponses alloimmunes (GVHD). Cependant, un environnement immunodéprimé peut également diminuer la capacité du système immunitaire à détecter et à détruire les cellules cancéreuses résiduelles ce qui favorise ainsi la rechute. Figure adaptée de (Oparaugo *et al.*, 2023).

Lors de la HSCT, quelques Tregs sont naturellement présents dans le greffon du donneur et ceux-ci ont pour rôle de réguler la GVHD. Les Tregs représentent 5 à 10 % du compartiment des lymphocytes T chez la souris et l'homme. En effet, lorsqu'ils sont déplétés du greffon, le développement de la GVHD est considérablement accéléré. Par contre, l'ajout de Tregs isolés au moment de la transplantation retarde considérablement, voire prévient, la GVHD. De ce fait, les Tregs peuvent contrôler les réponses alloréactives en supprimant de manière précoce l'expansion des lymphocytes T alloréactifs du donneur et jouent donc un rôle essentiel dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi. Ils représentent donc un outil thérapeutique pour contrôler la GVHD lors d'une allogreffe sans inhiber l'effet GvT médié par les lymphocytes T conventionnels du donneur (Cohen *et al.*, 2002; Edinger *et al.*, 2003; Hannon *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2021). Matthias Edinger et son équipe ont, en effet, démontré le potentiel immunosuppresseur des Tregs pour supprimer la GVHD sans perdre l'effet GvT bénéfique (Edinger *et al.*, 2003).

Chez un individu atteint d'un cancer et ayant subi une HSCT, certains immunosuppresseurs, comme les inhibiteurs de m-TOR, agissent sur les voies de signalisation en aval du récepteur à l'IL-2. Ces médicaments bloquent davantage les Teff, qui dépendent essentiellement de la voie mTOR, tout en affectant moins les Tregs, qui utilisent principalement la voie STAT5. Cette différence de sensibilité favorise l'expansion des Tregs par rapport aux Teff,

augmentant ainsi le ratio Tregs/Teff et contribuant à réduire le risque de GVHD en diminuant les réponses allogéniques (Ehx *et al.*, 2021). Cependant, un environnement immunodéprimé peut également compromettre la capacité du système immunitaire à détecter et à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles (effet GvL). En conséquence, cela peut favoriser la rechute du cancer en permettant la survie et la croissance des cellules tumorales (Oparaugo *et al.*, 2023). Néanmoins, dans le contexte de la transplantation de CSH, les Tregs jouent un rôle dans la prévention de la GVHD en inhibant les réponses immunitaires excessives dirigées contre les tissus du receveur. Cette modulation immunosuppressive des Tregs aide à minimiser l'inflammation et les dommages tissulaires associés à la GVHD, contribuant ainsi significativement à l'amélioration des résultats de la transplantation. Néanmoins, il est important de souligner que, bien que les Tregs aient un rôle protecteur en limitant la GVHD, un excès de leur fonction suppressive pourrait compromettre l'effet GvT. Ainsi, maintenir un équilibre précis dans l'action des Tregs demeure essentiel pour optimiser les résultats globaux de la transplantation (Watanabe *et al.*, 2011; Dekker *et al.*, 2020).

D'autre part, il a également été rapporté qu'une fonction excessive des Tregs favorise la progression du cancer chez la souris car leur déplétion induit une régression des tumeurs transplantées en améliorant les réponses anti-tumorales par les lymphocytes T. Il existe de plus en plus de preuves que les Tregs contribuent également à la progression du cancer chez l'homme (Gauthy *et al.*, 2013). Cette implication est appuyée par des modèles

expérimentaux murins de HSCT mal appariées où la co-infusion de Tregs avec des lymphocytes T conventionnels favorise la reconstitution immunitaire post-greffe et prévient la GVHD. De ce fait, Mauro Di Lanni et son équipe ont évalué l'impact sur la prévention de la GVHD et la reconstitution immunitaire lors d'une perfusion précoce de Tregs, suivie de T conventionnels chez 28 patients atteints d'hémopathie maligne ayant subi une HSCT non appariées. Ils ont démontré pour la première fois chez l'homme que le transfert de Tregs prévenait la GVHD en l'absence de toute immunosuppression post-transplantation, favorisait la reconstitution de la lignée lymphoïde, améliorait l'immunité des patients greffés face aux pathogènes opportunistes et n'affaiblissait pas l'effet GvT (Di lanni *et al.*, 2011).

En parallèle, la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes T mémoires ou effecteurs joue un rôle significatif dans l'immunité contre les agents pathogènes (Figure 8). Une fois qu'une CPA présente à un lymphocyte T naïf l'antigène pathogène sous forme de peptide associé aux molécules CMH, les lymphocytes T vont s'activer, augmenter en nombre (prolifération clonale) et se différencier ensuite en cellules effectrices qui migreront, à leur tour, vers le site de l'infection pour éliminer l'agent pathogène. Les cellules effectrices possèdent une courte durée de vie tandis que les cellules mémoires possèdent un potentiel de survie à long terme. Les cellules mémoires peuvent être localisées soit dans les organes lymphoïdes secondaires, à une fréquence moyenne de 20% et seront nommées lymphocytes mémoires centrales (TCM) ou dans

les tissus récemment infectés et seront nommées lymphocytes T mémoires effecteurs (TEM).

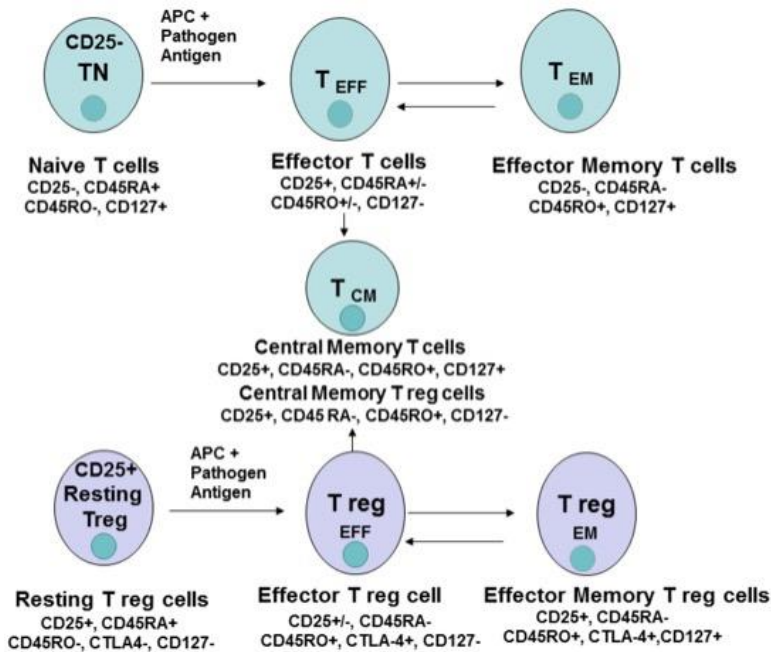


Figure 8. Processus de différenciation des lymphocytes T CD4+. Ceci implique l'expression de marqueurs spécifiques aux différentes étapes de différenciation. Figure venant de (Golubovskaya and Wu, 2016).

Lors d'une nouvelle exposition à un même antigène, les lymphocytes T mémoires subissent une expansion rapide et provoquent une réponse immunitaire secondaire plus efficace et plus rapide par rapport à la réponse immunitaire primaire en éliminant l'infection (Golubovskaya and Wu, 2016; Rosenblum *et al.*, 2016; Oparaugo *et al.*, 2023). Les lymphocytes T mémoires effecteurs terminaux (TEMRA) CD4+ sont, quant à eux, rarement détectés, comme par exemple chez des individus infectés par le virus de la Dengue. Chez ces sujets, une expansion avec une fonction cytotoxique est observée ce qui leur confère un rôle de

protection. Ces résultats ont permis d'établir le fait que certains virus déclenchent la différenciation terminale des lymphocytes T CD4+ effecteurs en TEMRA CD4+ mettant en évidence un lien entre cette différenciation et la charge antigénique ou à la persistance de celui-ci (Weiskopf *et al.*, 2015).

Les lymphocytes T CD8+ naïfs se différencient en cellules mémoires souches (TSCM), en TCM, en TEM et en Teff. Les différents marqueurs des lymphocytes T CD8+ lors de la différenciation cellulaire sont la L-Selectine, le CD45RO, le CD45RA et le CCR7. La fonction effectrice augmente lors de la différenciation des cellules T CD8+, tandis que la fonction mémoire et la prolifération diminuent (Figure 9).

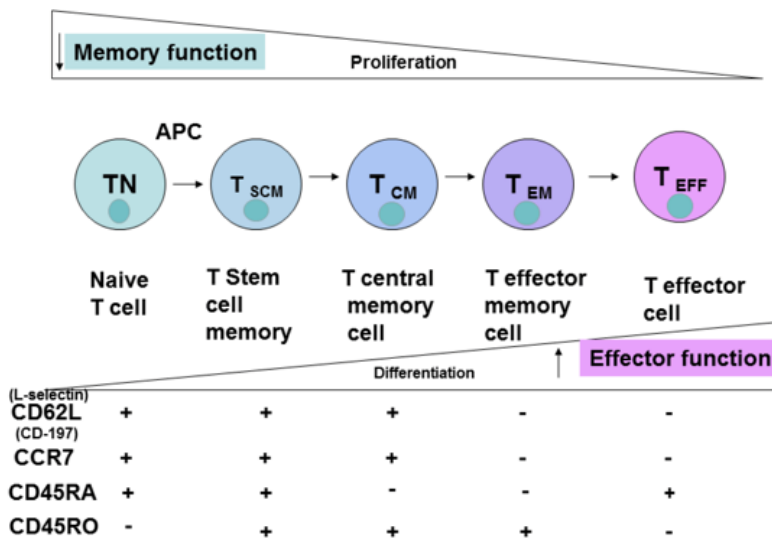


Figure 9. Processus de différenciation des lymphocytes T CD8+. TN : lymphocyte T naïf, TSCM : cellules souches mémoires des lymphocytes T, Teff : lymphocytes T effecteurs. Figure venant de (Golubovskaya and Wu, 2016).

Les lymphocytes T cytotoxiques, quant à eux, sont spécialisés dans la destruction des cellules infectées par des agents pathogènes et

des cellules cancéreuses. En plus de ces sous-populations principales, les lymphocytes T se diversifient davantage en plusieurs catégories. Les lymphocytes T naïfs CD45RA+CCR7+ sont ceux qui n'ont pas encore été exposés à leur antigène spécifique. Après activation, certains lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes T mémoires, qui sont prêts à engendrer une réponse immunitaire rapide en cas de réexposition à un antigène précédemment rencontré. Parmi les lymphocytes T mémoires, trois sous-populations principales sont distinguées : les TCM, les TEM et les cellules T mémoires résidentes dans les tissus (TRM) (Figure 10). Contrairement aux TCM et TEM, qui sont bien caractérisés, les TRM persistent dans les tissus, ne recirculent pas dans le sang et fournissent une protection immédiate contre les pathogènes lors d'une réinfection (Wu *et al.*, 2018).

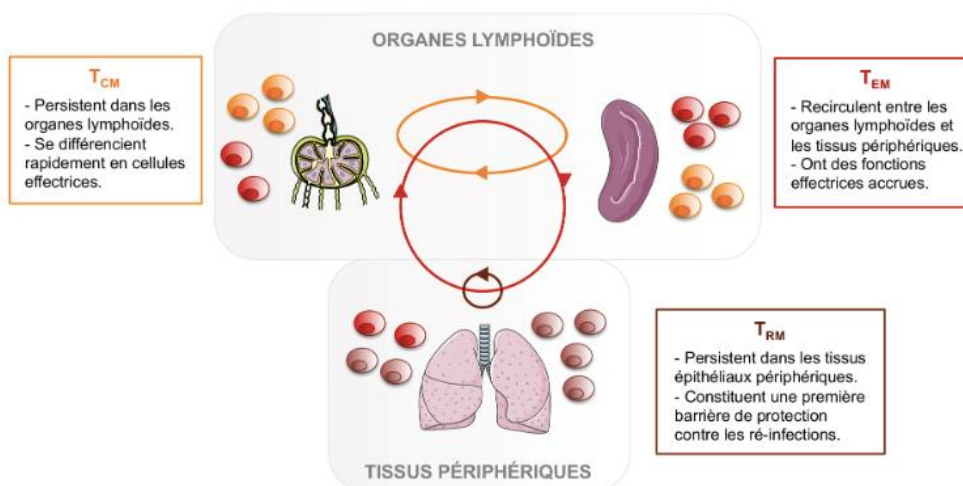


Figure 10. Localisation et fonction des différentes sous-populations de lymphocytes T mémoires (TCM, TEM, TRM). Les flèches indiquent les zones de recirculation ou de résidence de ces trois types de lymphocytes T mémoires. Figure adaptée du site <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/les-lymphocytes-trm-sentinelles-du-systeme-immunitaire>

Les TRM expriment la lectine de type C (CD69), marqueur d'activation précoce des lymphocytes T et favorisant leur sortie des ganglions lymphatiques vers les tissus où ils seront retenus. Ils expriment également le marqueur CD103, formé par la dimérisation des sous-unités αE et $\beta 7$ de l'intégrine et qui interagit avec la cadhérine E exprimée par les cellules épithéliales intestinales (Carpenter and Bosselut, 2010). Cependant, le phénotype des TRM est très hétérogène en fonction de leur localisation, suggérant que la différenciation des TRM est influencée par leur environnement tissulaire. Des TRM dépourvues de CD103 ont été décrites dans l'intestin, les organes lymphoïdes secondaires et le foie. D'autres TRM dépourvues de CD103 et de CD69 ont été décrites dans le pancréas, les glandes salivaires et le système reproducteur féminin (Cauley and Lefrançois, 2013; Schenkel and David Masopust, 2014; Mueller and Mackay, 2016). Dès lors, il est concevable que les TRM du donneur et du receveur puissent influencer le résultat de la transplantation en facilitant la GVHD ou le rejet du greffon. Cependant, la proportion de lymphocytes T alloréactifs parmi le sous-ensemble TRM et la contribution potentielle de telles cellules après la transplantation restent à déterminer (Shlomchik *et al.*, 1999; Michalek *et al.*, 2011; Abken, 2015; Madhusudhanan Sukumar *et al.*, 2016; Benichou *et al.*, 2017).

Les TCM, caractérisés par le profil d'expression de CD45RA-CCR7+CD62L+, résident dans la circulation et les organes lymphoïdes secondaires qui sont les organes « centraux » où les réponses immunitaires se développent. En effet, CCR7 et CD62L

sont des marqueurs de migration lymphoïde. Ils se maintiennent à long terme en se renouvelant de manière autonome. Ils ont donc une capacité proliférative élevée. Bien qu'ils n'aient pas d'activité effectrice directe, ils peuvent rapidement se différencier en lymphocytes T effecteurs en cas de réinfection. Ils sont, en effet, capables de produire de l'IL-2 et des cytokines effectrices lors d'une stimulation (Lipp *et al.*, 1999; Gattinoni *et al.*, 2012).

En revanche, les TEM sont caractérisés par le profil CD45RA-, CCR7- et de CD62L-. Ils circulent entre le sang et les tissus périphériques tels que les poumons, l'intestin grêle, le côlon et la rate. Les TEM constituent 20 à 50 % du pool de lymphocytes T des ganglions lymphatiques (Thome *et al.*, 2014). Contrairement aux TCM, ils possèdent des fonctions effectrices plus prononcées en produisant davantage de cytokines effectrices. En conséquence, ils agissent de manière plus rapide et plus efficace que les lymphocytes T effecteurs, initialement générés lors de la première infection¹ (Lipp *et al.*, 1999; Gattinoni *et al.*, 2012). Les TEM contribuent à la réponse immunitaire à long terme et les lymphocytes CD8+ différenciés de manière terminale en mémoires effectrices CD45RA+ (TEMRA), caractérisés par l'expression de CD45RA+CCR7-, sont, quant à eux, également associés à des réponses immunitaires rapides. Ces cellules réexpriment le marqueur de surface des lymphocytes T naïfs CD45RA tout en régulant à la baisse l'expression des marqueurs CCR7, CD62L et

¹ <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/les-lymphocytes-trm-sentinelles-du-systeme-immunitaire>

CD28 mais représentent un stade terminal de différenciation effectrice (Best, 2013; Pearce *et al.*, 2013; Madhusudhanan Sukumar *et al.*, 2016). En effet, ils ont une capacité de prolifération plus faible mais des capacités effectrices plus étendues avec une production élevée d'IFN- γ . Les TEMRA, principalement présents dans la lignée des lymphocytes T CD8+, sont localisés dans le sang, la rate, la moelle osseuse et les poumons avec une fréquence moyenne de 30% (Thome *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2017; Martin and Badovinac, 2018; Jachimowicz and Guenther, 2019; Miron *et al.*, 2021). Il a été rapporté que la fréquence des TEMRA CD8+ présents dans le sang et la moelle osseuse augmente avec l'âge, en particulier chez les donneurs séropositifs pour le cytomégalo virus (CMV) suggérant ainsi que les TEMRA possèdent un rôle dans les infections persistantes (Di Benedetto *et al.*, 2015; Gordon *et al.*, 2017).

Dans l'ensemble, les lymphocytes T et leurs sous-populations jouent des rôles spécifiques dans la réponse immunitaire, allant de la coordination de la réponse immunitaire à la suppression des réponses immunitaires excessives ainsi qu'à la formation de la mémoire immunitaire. Cette diversité fonctionnelle est essentielle pour la protection de l'organisme contre les infections et la préservation de la tolérance envers les antigènes du soi.

1.2.2.1.1 Intervention de l'IL15 dans la phase thymo-indépendante

L'implication de l'interleukine-15 (IL-15) dans la phase thymo-indépendante de la reconstitution immunitaire constitue un aspect majeur et complexe de la réponse immunitaire après une greffe de CSH. L'IL-15, une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle essentiel dans la régulation de l'immunité innée et adaptative, est produite par diverses cellules telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules stromales. Cette cytokine stimule la croissance et l'activation des lymphocytes T ainsi que des cellules NK (Sauter *et al.*, 2012).

La phase thymo-indépendante se caractérise donc par une activation rapide des cellules immunitaires. Elle comprend l'expansion homéostatique des lymphocytes T matures présents dans la greffe, en réponse à la lymphopénie et aux niveaux élevés d'IL-15 et d'IL-7 qui en résultent. Sous l'effet de ces signaux, les lymphocytes T du donneur identifient rapidement les tissus du receveur comme des cibles à attaquer (Velardi, Tsai and van den Brink, 2021). Dans cette phase, l'IL-15 peut jouer un rôle en stimulant les lymphocytes T du donneur, favorisant leur survie et leur prolifération ce qui entraîne des attaques contre les tissus du receveur. Cette intervention de l'IL-15 peut donc contribuer à l'inflammation systémique et aux lésions tissulaires observées dans la GVHD aiguë (Hagel *et al.*, 2010; Thiant *et al.*, 2010). Cependant, il convient de noter qu'il existe une controverse dans la littérature concernant cette corrélation, certaines études ne parvenant pas à

confirmer une association entre des niveaux élevés d'IL-15 tôt après la transplantation et l'apparition ultérieure de la GVHD aiguë de grade II à IV (Abu-Ghosh *et al.*, 1999; Bolotin *et al.*, 1999; de Bock *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont quasiment indétectables pendant un à deux mois après une allogreffe de CSH et finissent par se normaliser environ un an après (Figure 11). Concernant la reconstitution d'un pool normal de lymphocytes B mémoires, celle-ci peut prendre jusqu'à 2 à 5 ans après une allogreffe de CSH et davantage chez les patients recevant des anticorps monoclonaux anti-CD20 après la transplantation comme par exemple, dans le cadre d'un traitement à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Après une transplantation de CSH, les premiers lymphocytes B qui apparaissent à nouveau dans la circulation sanguine sont identifiés comme des lymphocytes B transitionnels (CD19+CD21^{low}CD38^{high}). Ces cellules, provenant de la moelle osseuse, vont progressivement acquérir l'expression du marqueur CD21 pour constituer les précurseurs des lymphocytes B naïfs (CD19+CD21^{high}CD27⁻). Ceux-ci vont, à leur tour, se différencier en lymphocytes B mémoires (CD19+CD27⁺) à la suite d'une exposition à un antigène (Ag) (Avanzini *et al.*, 2005; Van Der Maas *et al.*, 2019; Canti *et al.*, 2021).

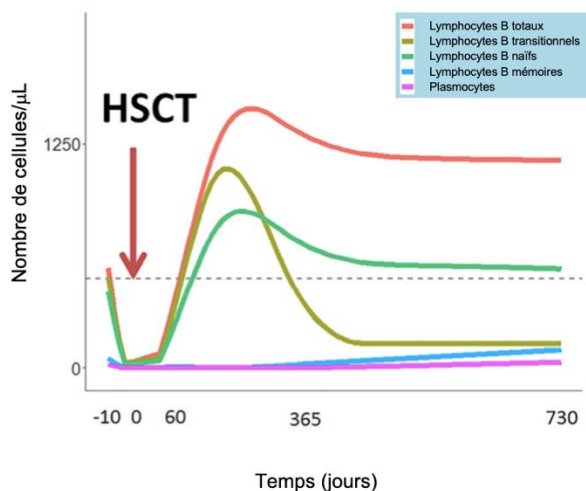


Figure 11. Reconstitution des lymphocytes B après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Schéma hypothétique illustrant la reconstitution des sous-populations de lymphocytes B après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les premières cellules à émerger dans la circulation sanguine périphérique sont les lymphocytes B transitionnels. Au cours de la première année, une diminution du nombre de lymphocytes B transitionnels est observée, ceux-ci sont remplacés par des lymphocytes B naïfs matures. Ces derniers se différencient, ensuite, en lymphocytes B mémoires et en plasmocytes. Figure adaptée de (Van Der Maas *et al.*, 2019).

2. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

La GVHD représente la principale complication après une HSCT allogénique, constituant l'une des principales causes de morbidité et de mortalité, avec une incidence de plus de 10 % des patients succombant à cette complication (MacMillan *et al.*, 2015; Nassereddine *et al.*, 2017). Ceci souligne l'importance cruciale d'une bonne gestion ainsi que d'une prévention efficace de la GVHD dans le contexte des HSCT.

Il est essentiel de distinguer la GVHD aiguë, qui est une maladie inflammatoire touchant la peau, le tube digestif et/ou le foie survenant, le plus souvent, dans les 100 premiers jours suivant une HSCT allogénique. Tandis que la GVHD chronique, qui est une maladie évoluant souvent vers la fibrose, débute généralement plus tardivement. L'incidence de la GVHD aiguë atteint les 50 % chez les patients subissant une HSCT provenant d'un donneur apparenté avec des HLA compatibles, avec une incidence généralement plus élevée en cas de donneurs non apparentés (Ferrara *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2018; Akahoshi *et al.*, 2023). La GVHD chronique quant à elle, a un taux d'occurrence variant entre 6 % et 80 % (Atkinson *et al.*, 1990).

2.1 La maladie du greffon contre l'hôte aiguë

Le diagnostic de la GVHD aiguë, souvent confirmé par des biopsies, repose sur l'évaluation des symptômes cliniques. La gravité de la maladie est classée en quatre grades en fonction de l'atteinte des principaux organes cibles tels que la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal (Harris *et al.*, 2016). Les symptômes cutanés, qui sont les plus courants lors de la GVHD aiguë, se manifestent habituellement par une éruption maculo-papuleuse, avec une érythrodermie et la survenue de décollements cutanés dans les cas les plus sévères. Les atteintes du foie se caractérisent par une hyperbilirubinémie due à des lésions des petits canaux biliaires qui se manifestent par une jaunisse (Ball and Egeler, 2008). Les atteintes gastro-intestinales, quant à elles, se traduisent par des

symptômes tels que des nausées, des vomissements, de la diarrhée et des douleurs abdominales.

La classification de MAGIC (Harris *et al.*, 2016) a été établie concernant la GVHD aiguë divisant celle-ci en quatre grades cliniques globaux basés sur l'atteinte la plus sévère de l'organe cible (Tableau 1) :

- Grade 0 : Pas de stade 1-4 d'aucun organe,
- Grade I (léger) : Stade 1 à 2 de la peau sans atteinte du foie, des voies digestives supérieures ou des voies digestives inférieures,
- Grade II (modéré) : Éruption cutanée de stade 3 et/ou foie de stade 1 et/ou système digestif supérieur de stade 1 et/ou système digestif inférieur de stade 1,
- Grade III (sévère) : Stade 2-3 du foie et/ou stade 2-3 de l'appareil digestif inférieur, avec stade 0-3 de la peau et/ou stade 0-1 de l'appareil digestif supérieur,
- Grade IV (très sévère) : Stade 4 de la peau, du foie ou de la partie inférieure du système digestif, avec stade 0-1 de la partie supérieure du système digestif.

Tableau 1. Score de sévérité de la GVHD aiguë selon la classification de MAGIC. Tableau adapté de (Harris *et al.*, 2016).

Grade	Peau (érythème actif uniquement)	Foie (bilirubine)	Voie digestive supérieure	Voie digestive inférieure (nombre de selles par jour)
0	Pas d'éruption active (érythémateuse) de la GVHD	< 2 mg/dl	Absence ou intermittence de nausées, de vomissements ou d'anorexie	Adulte : < 500 ml/jour ou <3 épisodes/jour Enfant : < 10 ml/kg/jour ou <4 épisodes/jour
1	Éruption maculo-papuleuse <25% de la surface corporelle	2–3 mg/dl	Nausées, vomissements ou anorexie persistants	Adulte : 500–999 ml/jour ou 3–4 épisodes/jour Enfant : 10–19.9 ml/kg/jour ou 4–6 épisodes/jour
2	Éruption maculo-papuleuse 25 – 50% de la surface corporelle	3.1–6 mg/dl	-	Adulte : 1000–1500 ml/jour ou 5–7 épisodes/jour Enfant : 20 – 30 ml/kg/jour ou 7–10 épisodes/jour
3	Éruption maculo-papuleuse > 50% de la surface corporelle	6.1–15 mg/dl	-	Adulte : >1500 ml/jour ou >7 épisodes/jour Enfant : > 30 ml/kg/jour ou >10 épisodes/jour
4	Érythrodermie généralisée (> 50 % de la surface corporelle) plus formation bulleuse et desquamation > 5 % de la surface corporelle	>15 mg/dl	-	Douleur abdominale sévère avec ou sans iléus, ou selles manifestement sanguinolentes (quel que soit le volume des selles).

La physiopathologie de la GVHD aiguë comprend plusieurs phases distinctes, et chaque étape joue un rôle crucial dans l'amorce et le développement ultérieur de la maladie. En premier lieu, il y a la phase d'initiation, suivie de la phase d'induction et, pour terminer, la phase effectrice (Figure 12).

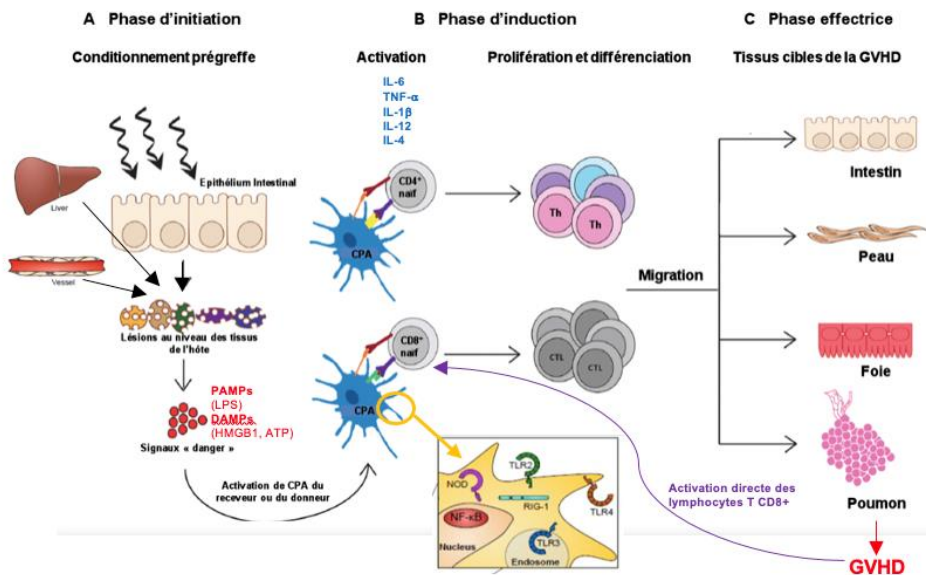


Figure 12. Les trois étapes du processus physiopathologique de la GVHD aiguë. **A)** La phase d'initiation débute avec le régime de conditionnement préalable à la greffe de CSH causant des lésions tissulaires, en particulier au niveau intestinal. La libération de cytokines pro-inflammatoires entraîne une surexpression des molécules du CMH, de co-stimulation et d'adhésion, intensifiant ainsi la présentation d'allo-antigènes par les CPA aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ du donneur. **B)** La phase d'induction implique la liaison du TCR et la co-stimulation conduisant à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T. Lorsque les lymphocytes T alloréactifs prolifèrent, ils se différencient en plusieurs sous-populations, sous l'influence des cytokines environnantes. Les lymphocytes T activés peuvent sécréter des cytokines inflammatoires, exprimer des récepteurs aux chimiokines et migrer vers les organes cibles de la GVHD aiguë. La production de chimiokines dans les tissus lésés entraîne le recrutement d'autres types cellulaires (cellules NK, neutrophiles, monocytes) contribuant davantage ainsi à la GVHD. **C)** La phase effectrice se caractérise par la destruction des tissus de l'hôte par les perforines, les granzymes, l'IFN- γ et le TNF- α , aboutissant aux manifestations cliniques de la GVHD aiguë. Figure adaptée de (Fu, Heinrichs and Yu, 2014).

Jetons un regard approfondi sur ces phases pour mieux appréhender les mécanismes biologiques à l'œuvre lors de cette réponse immunitaire aberrante.

2.1.1 Phase 1 : dommages tissulaires et activation des cellules présentatrices d'antigène

Pendant la phase d'initiation, le régime de conditionnement de la HSCT allogénique entraîne des lésions tissulaires qui activent les CPA de l'hôte, telles que les cellules dendritiques et les macrophages. Ces CPA activées produisent une cascade de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α et l'IL-12, qui induisent, à leur tour, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que des espèces réactives de l'azote (RNS) comme le superoxyde, le monoxyde d'azote, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'azote et leurs sous-produits. Cette réaction inflammatoire intense est nécessaire pour initier et réguler la réponse immunitaire adaptative (Ramadan and Paczesny, 2015).

Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α nécessitent des ROS pour leur activation (Ramadan and Paczesny, 2015). En revanche, les cytokines anti-inflammatoires telles que le facteur de croissance transformant (TGF- β), l'IL-10 et l'IL-4 ont la capacité de réduire les effets des ROS/RNS tout en possédant des propriétés antioxydantes (Saraiva and O'Garra, 2010). Ces cytokines participent à moduler l'intensité de la réponse inflammatoire et à promouvoir la résolution des dommages tissulaires induits par le conditionnement. Toutefois, il est essentiel de noter que les interactions complexes entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires régulent la production de ROS/RNS et influencent la dynamique de la réponse immunitaire post-HSCT (Toubai *et al.*, 2016).

Le déclenchement de la GVHD est également initiée par la reconnaissance de motifs associés aux dangers pathogènes (PAMPs) et aux motifs associés aux dommages (DAMPs) par les cellules du système immunitaire inné. Ces motifs sont détectés par les récepteurs de reconnaissance de motifs PRR tels que les TLR qui, via la voie de signalisation NF κ B, induisent l'activation des cellules en modulant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, des interférons de type 1, des chimiokines ou des molécules de co-stimulation qui sont indispensables pour l'activation de la réponse immunitaire adaptative ainsi que les récepteurs cytosoliques de type NLR (NOD) qui conduisent à la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β ² (Tableau 2).

En résumé, les interactions complexes entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, ainsi que leur influence sur la production de ROS/RNS, sont essentielles pour moduler la réponse immunitaire post-HSCT ainsi que pour gérer le risque de GVHD tout en préservant l'efficacité de la réponse contre les pathogènes et les cellules cancéreuses résiduelles.

² <https://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunité-et-vaccination/thematiques/immunité-innée-barrières-naturelles-et-réaction-inflammatoire/déclenchement-de-la-réponse-inflammatoire-rôle-des-récepteurs-de-l2019immunité-innée>

Tableau 2. PAMPs et DAMPs liés à la GVHD ainsi que leurs voies de signalisation et leurs effets dans la GVHD. Tableau adapté de (Ramadan and Paczesny, 2015).

		Voie de signalisation	Effet
PAMPs	lipopolysaccharide	TLR4/MyD88 ou TRIF	Aggravation
	TLR7 = PRR	TLR4/MyD88	Aggravation
	Flagelline	TLR4/MyD88	Réduction
	Microflore intestinale	TLR4/MyD88	Aggravation
	Peptidoglycane	TLR4/MyD88 ou NOD1	Pas encore étudié
DAMPs	ATP	NOD2	Aggravation
	Protéine S100	NOD2	Aggravation
	HMGB-1	TLR2/4/MyD88	Aggravation
	Protéine Reg III	Famille IL-22/IL-17/IL-1	Marqueur intestinal de la GVHD
	HSP	CD14/TLR4/MyD88	Aggravation
	Sulfate d'héparane	TLR4/MyD88	Aggravation
	Acide urique	NOD2/NLRP3	Aggravation
	Elafine	NFκB	Marqueur cutané de la GVHD
	Défensines	Sécrétées	Protection
	IL-33	MyD88	Marqueur d'un traitement réfractaire à la GVHD

Les PAMPs tels que les lipopolysaccharides, l'ARN double brin, la flagelline, les peptides issus du microbiote et le peptidoglycane produits par des pathogènes (bactéries, champignons, virus) induisent la production de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules myéloïdes et épithéliales via les récepteurs de type toll (ex : TLR4, TLR7) et les récepteurs avec un domaine de liaison aux nucléotides (ex : NOD1). Il en résulte une activation de la voie de différenciation de la protéine cytoplasmique de réponse primaire à la différenciation myéloïde 88 (MyD88) dans les CPA ce qui entraîne leur maturation - expression majorée de HLA et des molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) - et augmente, in fine, la GVHD. En effet, les CPA, en particulier les CD du receveur sont ainsi sensibilisées par le conditionnement. Cette sensibilisation les

transforme en capteurs puissants des PAMPs ce qui conduit à leur activation. Par conséquent, cela entraîne une présentation accrue du CMH aux lymphocytes T.

Les DAMPs tels que la protéine de la boîte 1 à haute mobilité (HMGB-1), l'ATP, les protéines S100, la protéine Reg III, les protéines de choc thermique (HSP), le sulfate d'héparane, l'élafine, les défensines, l'acide urique ou encore IL-33, sont des molécules qui ne se trouvent normalement pas dans l'espace extracellulaire qui sont libérées par des cellules endommagées ou stressées et sont également identifiées comme des déclencheurs de l'inflammation, et donc favorisent la GVHD aiguë. (Holler *et al.*, 2004; Ramadan and Paczesny, 2015; Toubai *et al.*, 2016; Zeiser, 2019). Effectivement, prenons l'exemple de l'ATP, qui peut aggraver la GVHD en activant les récepteurs purinergiques (P2X7R). Cette activation va entraîner un efflux de K⁺ favorisant l'assemblage de l'inflammasome et créer un microenvironnement pro-inflammatoire par la libération de cytokines (IL-1 β et l'IL-18) ce qui va permettre la migration des lymphocytes T allogéniques, suite à leur activation par les CPA exprimant P2X7, vers les organes cibles de la GVHD aiguë, principalement la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. Notons également qu'en plus des récepteurs purinergiques, l'ATP, tout comme l'acide urique, est capable d'activer l'inflammasome NLRP3 ce qui va engendrer la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β conduisant également au développement de la GVHD (Apostolova and Zeiser, 2016; Zeiser, 2019). In fine, ce mécanisme engendrera des lésions cellulaires qui amplifieront

encore davantage la libération de composants intracellulaires. Or, dans des conditions normales, les niveaux d'ATP sont maintenus sous contrôle par le CD39 qui va métaboliser l'ATP en adénosine monophosphate (ADP) qui, quant à lui, va être métabolisé par le CD73 en adénosine anti-inflammatoire (= axe adénosinergique). Par contre, lorsque ce système est perturbé, la gravité de la GVHD est accrue.

Les DAMPs, tout comme les PAMPs, activent les CPA de l'hôte telles que les cellules dendritiques et les macrophages qui présentent à leur tour des allo-antigènes via le CMH de type I ou de type II aux lymphocytes T du donneur (Figure 13). Ces CPA peuvent également activer les mastocytes, les basophiles, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales (Kambayashi and Laufer, 2014). Elles jouent donc un rôle central dans le déclenchement de la GVHD aiguë étant donné qu'elles sont suffisantes pour activer les lymphocytes T du donneur (Shlomchik *et al.*, 1999; Duffner *et al.*, 2004; Zeiser, 2019).

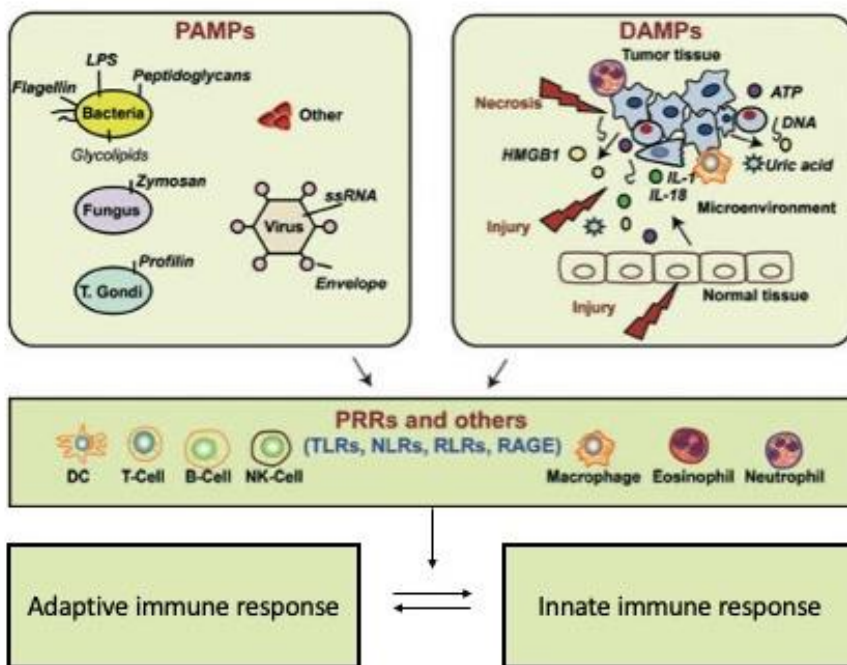


Figure 13. Les motifs PAMPs et DAMPs déclenchant des réponses immunitaires innées et adaptatives. Figure adaptée de (Tang *et al.*, 2012).

2.1.2 Phase 2 : activation et prolifération des lymphocytes T

Durant la phase précoce de la GVHD, les lymphocytes T alloréactifs du donneur présents dans le greffon vont s'activer, proliférer et se différencier en lymphocytes T effecteurs pour migrer dans les organes cibles et provoquer la GVHD aiguë. En effet, c'est à cette étape qu'ils vont identifier les tissus du receveur comme étant étrangers, considérant ceux-ci comme des cibles à attaquer et déclenchant ainsi une réponse immunitaire destructrice. Cette réaction peut provoquer une inflammation et des lésions tissulaires sévères, touchant principalement la peau, le foie et les intestins.

Certains facteurs prédictifs de l'apparition d'une GVHD modérée à sévère comprennent des niveaux plus élevés de disparité HLA, une discordance de genre entre le donneur et le receveur (Ferrara *et al.* 2009; Harris *et al.* 2013). En effet, il existe un risque accru lorsque le donneur est de sexe féminin et le receveur de sexe masculin (reconnaissance d'antigènes mineurs liés au sexe), surtout si la donneuse a été enceinte ou a reçu des transfusions sanguines non déleucocytées (allo-immunisation vis-à-vis d'allo-antigènes paternels ou des donneurs des dérivés sanguins). En effet, lorsqu'une femme est enceinte, son système immunitaire peut être exposé à des antigènes fœtaux d'origine paternelle déclenchant ainsi la production d'anticorps dirigés contre ces antigènes. Dès lors, en cas d'allogreffe femme → homme, les lymphocytes/anticorps préexistants de la donneuse peuvent reconnaître comme étrangers des antigènes présents et déclencher ainsi une réaction allo-immunitaire de rejet. D'autres facteurs de risque existent tels qu'un âge avancé tant chez le donneur que chez le receveur (système immunitaire moins tolérant), le recours aux cellules souches périphériques (plus riche en lymphocytes T), l'allo-immunisation du donneur, ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre le cytomégalo virus et le virus d'Epstein-Barr (Gale *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 2018). C'est pourquoi la déplétion des lymphocytes T présents dans le greffon du donneur pourrait sembler être la manière la plus efficace de prévenir la GVHD aiguë. Au contraire, l'administration de lymphocytes T en prévention ou en traitement de la rechute post-transplantation induit souvent une GVHD aiguë (Ho and Soiffer, 2001).

La phase d'activation et de polarisation des lymphocytes T par les CPA implique trois signaux simultanés d'activation (Figure 14). Le premier signal résulte de l'interaction entre le TCR et le CMH présentant un peptide antigénique. Le deuxième signal implique une co-stimulation générée par les interactions entre les molécules présentes sur les CPA telles que CD80/CD86, CD40, OX40L, ICOS-L et les molécules correspondantes présentes sur les lymphocytes T, à savoir CD28, CD40L, OX40, ICOS. Et enfin, le troisième signal consiste en l'activation des lymphocytes T par des cytokines sécrétées soit de manière autocrine par les lymphocytes T (IL-2) ou soit de manière paracrine par les CPA (IL-12) qui ont pour rôle d'assurer la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes T alloréactifs.

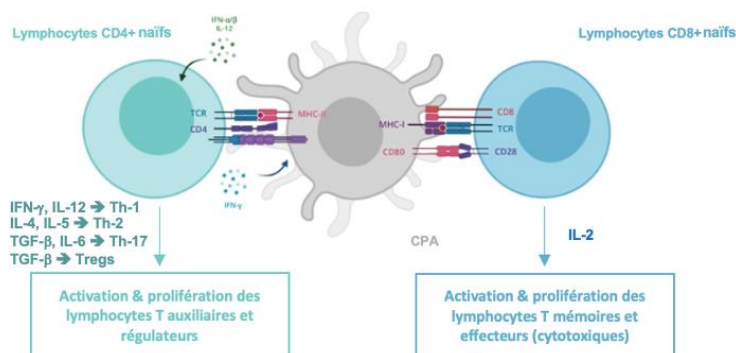


Figure 14. Activation des lymphocytes CD4+ et CD8+ par les CPA. Le TCR identifie de manière spécifique le complexe formé par une molécule de CMH associée à un peptide antigénique exposé à la surface des CPA. Le CMH-I, présent sur toutes les cellules nucléées (donc pas sur les érythrocytes) et le CMH-II, dont l'expression est induite et limitée aux CPA telles que les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les cellules épithéliales thymiques. Les peptides antigéniques liés aux molécules de

CMH-II proviennent de composants protéiques du milieu extracellulaire internalisés dans des vacuoles, tandis que ceux liés aux molécules de CMH-I résultent de la dégradation des protéines cytosoliques. Les lymphocytes T CD8+ sont spécialisés dans la reconnaissance des molécules du CMH-I, tandis que les lymphocytes T CD4+ ciblent celles du CMH-II. L'interaction entre le CMH-I et le TCR déclenche l'activation du lymphocyte T CD8+ naïf. Ce dernier entre alors dans un cycle de division cellulaire, libérant de l'IL-2 en abondance, un facteur clé de la prolifération lymphocytaire. À la suite de cette phase d'expansion clonale, les lymphocytes T se différencient en effecteurs sous l'influence paracrine d'autres cytokines. La différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs est modelée par l'interaction spécifique entre le CMH-II et le TCR, ainsi que par l'influence paracrine des cytokines produites par les CPA. De ce fait, les CPA rencontrées par les lymphocytes T CD4+ naïfs jouent un rôle crucial dans la formation des sous-populations lymphocytaires (Th1, Th2, Th17 et Tregs). Figure adaptée de <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2020-9-2/t-lymphocyte-immunophenotyping-using-multicolor-flow-cytometry>

2.1.3 Phase 3 : migration et effets

Après leur activation, les lymphocytes T vont effectuer une migration progressive des organes lymphoïdes secondaires vers les tissus cibles de la GVHD par chimiotactisme. Ce processus implique des interactions entre les molécules de sélectine, d'intégrine et les récepteur des chimiokines. En effet, pour quitter les ganglions lymphatiques, les lymphocytes T vont réduire l'expression de L-sélectine (CD62L) ainsi que le niveau d'expression du récepteur de chimiokines CCR7 et, en parallèle, augmenter l'expression du ligand de P-sélectine (PSGL1). Cela a pour but de favoriser le roulement sur l'endothélium vasculaire exprimant la P-sélectine, permettant ainsi la sortie des lymphocytes T depuis la circulation sanguine vers les tissus enflammés (Wysocki *et al.*, 2005).

La migration des lymphocytes T est fortement influencée par les récepteurs de chimiokines présents à leur surface, par le gradient

de chimiokines générées par les lésions tissulaires induites par le régime de conditionnement et par les cytokines inflammatoires. Ces signaux, combinés à l'augmentation des récepteurs de chimiokines, régulent le trafic et l'homéostasie des lymphocytes T dans divers tissus. Par exemple, le récepteur de chimiokine C-C de type 9 (CCR9) favorise l'homéostasie dans l'intestin et la peau, tandis que CCR4 et CCR10 dirigent la migration vers la peau. CXCR3, quant à lui, recrute des lymphocytes T avec un profil Th1 vers les sites inflammatoires tels que la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. Son inhibition a d'ailleurs montré une réduction de la gravité de la GVHD (Castor, Pinho and Teixeira, 2012).

Une fois infiltrés dans les tissus, les lymphocytes T alloréactifs du donneur induisent des lésions directes par activité cytotoxique ou indirectes en recrutant d'autres leucocytes tels que les cellules NK, les neutrophiles et les macrophages. L'activité cytotoxique des lymphocytes T implique la libération d'enzymes lytiques (perforine et granzyme) ou l'activation de la voie de signalisation Fas/FasL. La prédominance de la voie Fas/FasL est observée dans la GVHD hépatique, tandis que la voie impliquant la libération de perforine et de granzyme peut être prédominante dans la GVHD cutanée et gastro-intestinale. Les cellules NK recrutées contribuent à induire des lésions cellulaires en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et en augmentant les lésions tissulaires médiées par les lymphocytes T. Les médiateurs solubles de l'inflammation produits par les leucocytes participent également à soutenir la

boucle inflammatoire, difficile à contrôler une fois initiée (Van den Brink and Burakoff, 2002; Ferrara et al., 2009).

2.2 Prévention

Pour réduire le risque potentiel de développer une GVHD aiguë, les médecins utilisent des médicaments immunosuppresseurs pour contrôler l'activité des lymphocytes T et atténuer ainsi la réponse inflammatoire. Cependant, une inhibition immunitaire excessive peut également compromettre la capacité du patient à combattre les infections et favoriser une rechute de la maladie via une perte de l'effet GvL, posant ainsi un défi délicat dans la gestion de l'équilibre entre la GVHD et le maintien de l'immunité contre les infections. La compréhension des mécanismes de régulation des lymphocytes T ainsi que leur interaction avec d'autres cellules immunitaires est donc déterminante pour développer des stratégies de traitement plus ciblées et efficaces dans la prévention et le traitement de la GVHD.

A l'heure actuelle, des inhibiteurs de la calcineurine, tels que le tacrolimus (Tac) et la ciclosporine (CyA), constituent des piliers de cette stratégie. Associés au sérum anti-lymphocytaire (antithymocyte globulin-ATG) et à un antimétabolite tel que le méthotrexate (MTX) ou le mycophénolate mofétil (MMF), ils sont fréquemment utilisés dans les greffes de CSH HLA-identiques. L'introduction récente du cyclophosphamide (PTCy) en post-transplantation associé à un inhibiteur de la calcineurine et à un

antimétabolite a révolutionné la prophylaxie offrant ainsi de nouvelles perspectives pour les greffes haplo-identiques apparentées et élargissant les possibilités dans les greffes HLA-identiques (Gooptu and Antin, 2021). Donc, en cas de greffe haplo-identique ou non-familiale avec une discordance dans le profil HLA, la prévention consiste en l'administration de PTCy avec un inhibiteur de la calcineurine ainsi qu'un antimétabolite. Et finalement, lorsqu'il s'agit de greffe de sang de cordon, on privilégie l'administration d'un inhibiteur de la calcineurine avec du MMF (Nelli Bejanyan *et al.*, 2016).

3. Traitements de la GVHD

La gestion de la GVHD représente un défi majeur dans les greffes de CSH allogéniques. Face à cette complexité, divers traitements et approches prophylactiques ont émergés pour atténuer les effets dévastateurs de la GVHD tout en préservant l'effet bénéfique de la greffe. Des avancées significatives dans la compréhension de la pathogenèse de la GVHD ont conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, offrant ainsi de l'espoir pour une meilleure qualité de vie et des résultats plus positifs pour les patients. Découvrons ensemble les approches novatrices qui façonnent l'avenir de la prise en charge de la GVHD.

3.1 Les traitements standards

Le traitement standard de la GVHD aiguë repose principalement sur l'utilisation de corticostéroïdes tels que la prednisone ou la méthylprednisolone, considérés comme le traitement initial de première intention. Ces agents anti-inflammatoires stéroïdiens régulent la réponse immunitaire, réduisant ainsi l'inflammation et supprimant l'activité des lymphocytes T effecteurs chez le receveur, lesquels sont impliqués dans le déclenchement de la GVHD. Cependant, il est important de noter que bien que les corticostéroïdes soient efficaces chez de nombreux patients, environ 50 % d'entre eux ne répondent pas de manière optimale à ce traitement initial ce qui peut conduire au développement d'une forme de la maladie appelée GVHD réfractaire aux stéroïdes (Van Lint *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2012; Martini, Chen and DeFilipp, 2022).

3.2 Les inhibiteurs Janus Kinases (JAKs)

Depuis peu, le traitement standard de deuxième ligne de la GVHD concerne les inhibiteurs de Janus kinases (JAK) et plus particulièrement le Ruxolitinib. Les JAK sont des tyrosines kinases intracellulaires responsables de la transmission des signaux provenant de divers récepteurs de cytokines qui sont situés à la surface des cellules immunitaires. Cette transmission s'effectue par la phosphorylation des protéines STAT (protéines de transduction du signal et activateurs de la transcription) qui sont présentes à

l'intérieur de la cellule. Une fois phosphorylées, les protéines STAT (pSTAT) se déplacent vers le noyau cellulaire. C'est à ce niveau qu'elles vont se lier aux activateurs et promoteurs afin de réguler la transcription des gènes cibles (Harrison, 2012).

3.2.1 La voie de signalisation JAK-STAT

La voie JAK/STAT a été identifiée au début des années 1990 et forme une famille de molécules de signalisation rapide de la membrane au noyau intervenant en aval de plus de 50 récepteurs aux cytokines. En effet, les JAK phosphorylent les protéines STAT intracellulaires en réponse à des signaux extracellulaires tels que des cytokines et facteurs de croissance qui, in fine, vont influencer sur le développement, la prolifération, la différenciation, l'activation de diverses cellules immunitaires impliquées dans la pathogenèse de la GVHD telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules T, les cellules B et les neutrophiles (Figure 15) ainsi que sur la migration cellulaire et l'apoptose (Abboud *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). Dès lors, la voie JAK/STAT joue un rôle clé dans la GVHD au travers des différents acteurs cités ci-dessus (Sugimoto *et al.*, 2003; Heine *et al.*, 2013; Jackson *et al.*, 2016). Effectivement, les JAK sont des régulateurs clés du développement de l'hématopoïèse et de la fonction des cellules immunitaires ce qui positionne ainsi la voie de signalisation JAK/STAT comme étant stratégique pour influencer les trois phases de la pathogenèse de la GVHD dans le cadre du traitement de conditionnement, de l'activation des lymphocytes T allogéniques du donneur après la greffe de CSH et, enfin, de la migration des cellules immunitaires responsables, in

fine, des dommages tissulaires (Schroeder *et al.*, 2018; Mahuzier *et al.*, 2020).

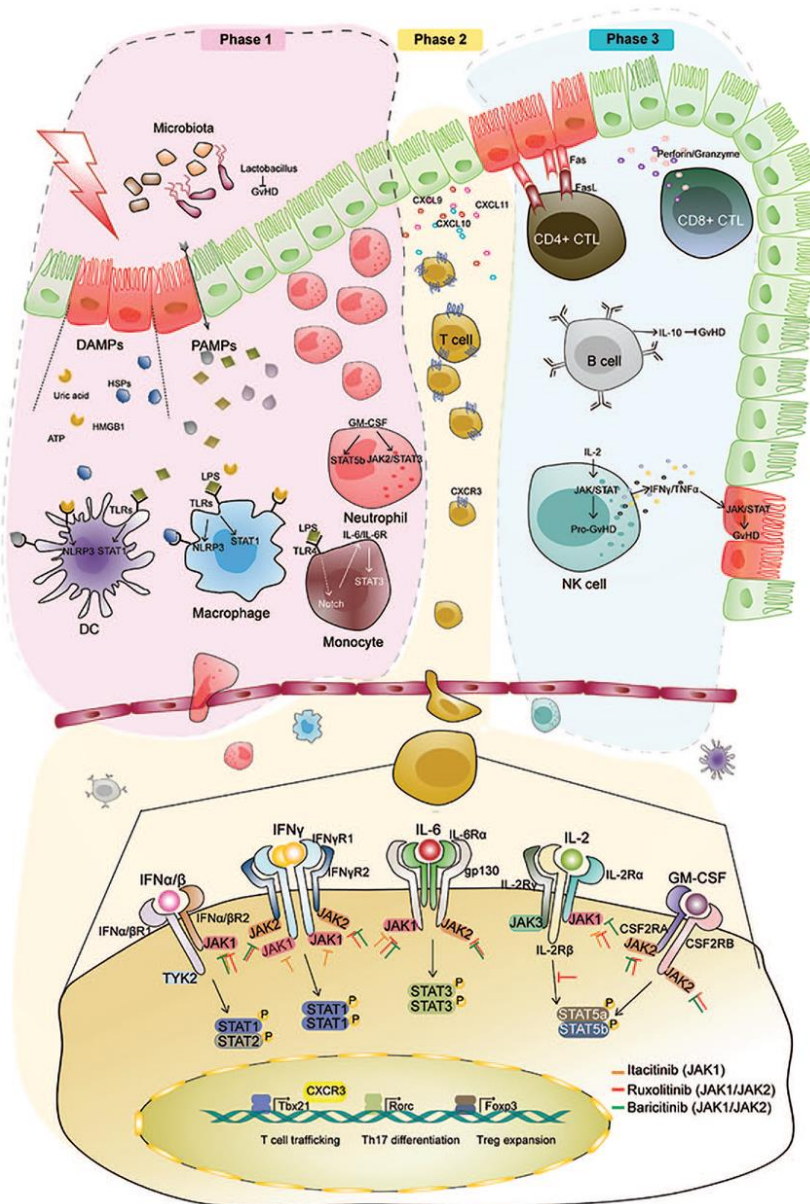


Figure 15. Rôle du système JAK/STAT dans la GVHD. En haut : Modèle en trois étapes illustrant la GVHD aiguë. En bas : Les flèches avec des têtes plates indiquent l'inhibition des JAK par l'Itacitinib (en orange), le Ruxolitinib (en rouge) et le Baricitinib (en vert), soulignant les interventions spécifiques de ces inhibiteurs dans le contexte de la GVHD. Figure de (Abboud *et al.*, 2020).

De manière plus détaillée, l'activation intracellulaire de la voie JAK/STAT se déclenche lorsque la liaison du ligand induit la multimérisation des sous-unités du récepteur. Certains ligands tels que l'érythropoïétine (EPO) ou le GM-CSF forment des sous-unités de récepteur liées en tant qu'homodimères tandis que d'autres ligands comme les interférons ou les interleukines génèrent des sous-unités de récepteur sous forme d'hétéromultimères. Concernant la propagation du signal, les domaines cytoplasmiques de deux sous-unités du récepteur, qu'il s'agisse d'homodimères ou d'hétéromultimères, doivent s'associer aux tyrosines kinases JAK (Figure 16) (El Jammal *et al.*, 2019).

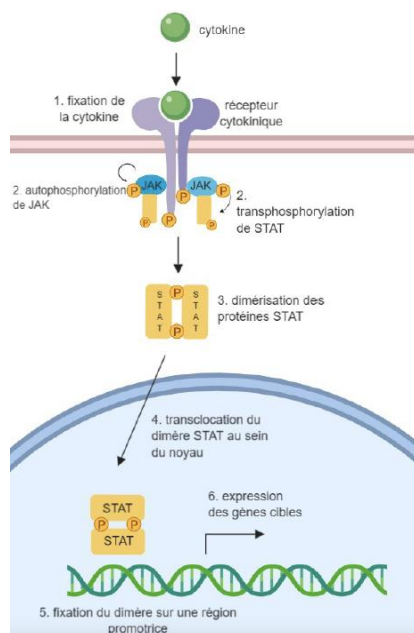


Figure 16. Activation de la voie de signalisation JAK/STAT. Lorsque le ligand cytotokinique se lie au récepteur, cela déclenche l'autophosphorylation et la transphosphorylation des protéines JAK. Ces événements conduisent à la phosphorylation des STAT, provoquant leur dimérisation. Le dimère résultant est,

ensuite, transporté dans le noyau cellulaire où il se lie aux promoteurs des gènes cibles, stimulant ainsi leur expression. Figure provenant de (El Jammal *et al.*, 2019).

La voie de signalisation JAK/STAT offre donc un mécanisme direct pour traduire un signal extracellulaire en une réponse transcriptionnelle. Une fois activée par phosphorylation dans le cytoplasme, les STAT vont migrer vers le noyau où les dimères de STAT vont se lier à des séquences régulatrices spécifiques pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles (Rawlings, Rosler and Harrison, 2004).

La famille JAK se compose de 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (protéine tyrosine kinase non réceptrice). Parmi eux, JAK1, JAK2, et JAK3 sont particulièrement pertinents dans le cadre de la GVHD, tandis que TYK2 semble jouer un rôle moins important dans ce contexte (Cetkovic-Cvrlje *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2012; Okiyama *et al.*, 2014; Spoerl *et al.*, 2014). Plus précisément, JAK1 participe à la transduction des signaux de l'IL-2, IL-6, IL-7, IL-21, INF α et IFN- γ ; JAK2 intervient dans la transduction des signaux de l'IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-23 et GM-CSF, ainsi que d'EPO et de thyroperoxydase (TPO) ; et JAK3 est impliqué dans la transduction des signaux de l'IL-2, IL-4, IL-7 et IL-21. La famille STAT, quant à elle, compte sept membres à savoir STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (Figure 17) (El Jammal *et al.*, 2019).

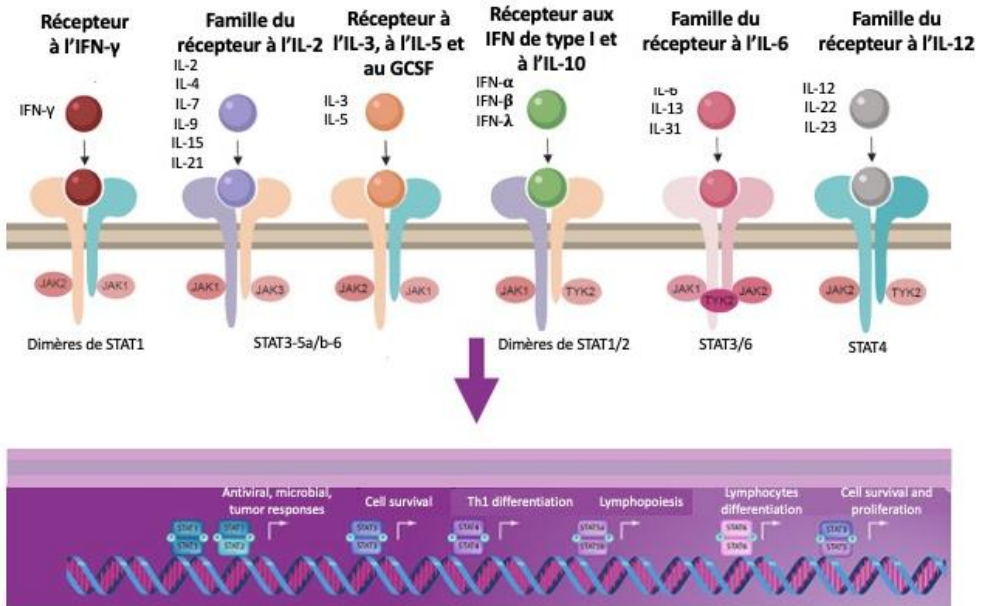


Figure 17. Cytokines et récepteurs JAK/STAT. L'activation des JAK induit la phosphorylation des STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 et STAT6) ce qui conduit à l'activation de différentes fonctions cellulaires. Figure adaptée de (El Jammal *et al.*, 2019).

Chaque JAK est donc activée par plusieurs cytokines, avec un certain chevauchement dans les effets en aval qui vont activer, à leur tour, des STAT spécifiques dont les effets peuvent également se chevaucher ou parfois être compétitifs pour des gènes spécifiques (Tableau 3).

Tableau 3. Récepteurs de cytokines et les voies JAK/STAT associées. EPO : érythropoïétine ; MPL : oncogène du virus de la leucémie myéloproliférative. Tableau adapté de (Abboud *et al.*, 2020).

Cytokines	JAKs	STATs
IFN- γ	JAK1/JAK2	STAT1/STAT1
IFN- α/β	JAK1/TYK2	STAT1/STAT2
IL-6	JAK1/JAK2	STAT3/STAT3
IL-12	JAK2/TYK2	STAT4/STAT4
IL-3	JAK2/JAK2	STAT5a/STAT5b
GM-CSF	JAK2/JAK2	STAT5a/STAT5b
IL-2	JAK1/JAK3	STAT5a/STAT5b
IL-4	JAK1/JAK3	STAT6/STAT6
IL-13	JAK1/JAK3	STAT6/STAT6
EPO	JAK2/JAK2	STAT3/STAT5
MPL	JAK2/JAK2	STAT3/STAT5

Des études précliniques sur modèles murins ont montré que l'inhibition sélective de JAK1 avec l'Itacitinib (Zeiser *et al.*, 2022; Etra *et al.*, 2023) ainsi que des JAK1/2 avec le Ruxolitinib (Spoerl *et al.*, 2014; Zeiser *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022) ou le Baricitinib (Kim *et al.*, 2022) pouvait réduire la gravité de la GVHD tout en préservant l'effet GvL. Ces résultats, qui seront présentés plus en détail dans le prochain paragraphe, suggèrent que la modulation de la voie JAK/STAT pourrait constituer une stratégie prometteuse pour atténuer les complications post-greffe en régulant les réponses immunitaires. En effet, ces études ont confirmé que la modulation de la voie JAK/STAT est une stratégie efficace pour prévenir la GVHD tout en maintenant une réponse anti-leucémique efficace (Choi *et al.*, 2014; Carniti *et al.*, 2015; Schroede *et al.*, 2018).

3.2.2 Les inhibiteurs JAK

Il est important de noter que l'inhibition de la voie JAK/STAT peut également compromettre la réponse immunitaire normale en

augmentant le risque d'infections et de cytopénies (Banerjee *et al.*, 2017).

Le Ruxolitinib est un inhibiteur de la voie de signalisation JAK1/2 utilisé initialement comme traitement des syndromes myéloprolifératifs comme la myélofibrose. Cependant, au cours des cinq dernières années, le Ruxolitinib est devenu également le traitement standard de deuxième ligne tant de la GVHD aiguë que de la GVHD chronique. Ceci a principalement été possible grâce aux études cliniques réalisées par R. Zeiser et son équipe. Avant cela, dans des modèles précliniques murins, c'est l'équipe de S. Spoerl qui a mis en évidence l'efficacité du Ruxolitinib dans le cadre de la GVHD aiguë. En effet, ils ont démontré que l'utilisation du Ruxolitinib entraînait une réduction de la prolifération des lymphocytes T effecteurs, une suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'allo-antigène chez la souris ainsi qu'une augmentation de la fréquence des Tregs. *In vivo*, l'inhibition de la voie de signalisation JAK1/2 a permis d'augmenter la survie des souris développant une GVHD aiguë en réduisant la classification histopathologique de la GVHD, le niveau sérique des cytokines pro-inflammatoires et l'expansion des lymphocytes T alloréactifs tout en augmentant le nombre de Tregs. Ceci s'explique par le fait que le Ruxolitinib inhibe la phosphorylation de STAT3 qui de base inhibe la formation de Treg à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs. De plus, il a également été démontré que le Ruxolitinib bloque la différenciation des lymphocytes T CD4+ en cellules produisant de l'IFN- γ et de l'IL-17A ; deux phénotypes de cellules T associés à la

GVHD. Sur base de ces résultats, cette même équipe, dans un second temps, a réalisé une étude clinique sur 6 patients atteints de GVHD réfractaire aux stéroïdes avec du Ruxolitinib. Tous les patients ont répondu en termes d'amélioration des symptômes cliniques de la GVHD et ont présenté des niveaux sériques de cytokines pro-inflammatoires moindre. Le Ruxolitinib permet donc de supprimer la production de cytokines pro-inflammatoires qui sont médiatrices de lésions tissulaires responsables de la pathogenèse de la GVHD tout en favorisant l'augmentation des Treg qui ont un rôle dans la tolérance immunitaire (Spoerl *et al.*, 2014). Une autre étude menée par E. Huarte et son équipe a également mis en évidence que l'inhibition de la voie de signalisation JAK1/2 par le Ruxolitinib lors d'une greffe xénogénique entraînait une diminution significative de l'activation des lymphocytes T alloréactifs ainsi qu'une infiltration dans les poumons et la peau permettant de conclure à une amélioration des symptômes de la maladie résultant d'une modulation immunitaire ciblée via l'inhibition de la voie de signalisation JAK (Huarte, Peel, Juvekar, Dubé, *et al.*, 2021). De ce fait, plusieurs études ont été réalisées et tendent vers cette même conclusion que le Ruxolitinib permet de réduire le développement de la GVHD (Khandelwal *et al.*, 2017; Maldonado *et al.*, 2017; Socié *et al.*, 2021) et ce, tout en conservant l'effet GvT d'après une étude menée par C. Carniti et son équipe sur une lignée cellulaire A20 (dérivée d'un néoplasme spontané des cellules du réticulum d'une souris BALB/cAnN) et RMB-1 (leucémie érythroïde de la souris) (Carniti *et al.*, 2015). Ensuite, R. Zeiser et ses collaborateurs ont démontré que le Ruxolitinib inhibait de manière significativement

remarquable la GVHD chronique dans des modèles murins. Sur cette base, ils ont donc partagé leurs observations avec d'autres spécialistes de la transplantation et, étant donné qu'à cette époque, le Ruxolitinib était déjà disponible pour le traitement de la myélofibrose, plusieurs greffeurs ont donc testé ce traitement dans le cadre d'études cliniques sur la GVHD réfractaire. Par la suite, ils ont publié une étude rétrospective dans laquelle 19 centres de transplantation de cellules souches en Europe et aux Etats-Unis ont rapporté les résultats de 95 patients ayant reçu du Ruxolitinib comme traitement de deuxième ligne de la GVHD réfractaire aux corticostéroïdes (RS-GVHD) avec un nombre médian de trois traitements antérieurs avant l'administration du Ruxolitinib. Les patients ont été classés en deux groupes : les patients ayant une RS-GVHD aiguë (n = 54, tous de grade III ou IV) ou les patients ayant une RS-GVHD chronique (n = 41, tous de grade II ou III). Les patients ayant une RS-GVHD aiguë ont présenté un objectif de réponse globale (ORR) de 81,5% dont 46,3% de réponses complètes tandis que pour les patients ayant une RS-GVHD chronique, l'ORR était de 85,4%, avec une majorité de réponses partielles (78%) et quelques réponses complètes (7,3%). Seulement 14,6% des patients n'ont pas répondu au traitement. Parmi les patients ayant répondu au Ruxolitinib, le taux de rechute pour ceux atteints d'une RS-GVHD aiguë était de 6,8% et de 5,7% pour ceux atteints de RS-GVHD chronique. La survie à 6 mois était de 79% pour les cas de RS-GVHD aiguë et de 97,4% pour les cas de RS-GVHD chronique. Notons néanmoins que la survenue de cytopénies (RS-GVHD aiguë : 55,6%, RS-GVHD chronique : 17,1%) et de réactivations du

CMV (RS-GVHD aiguë : 33,3%, RS-GVHD chronique : 14,6 %) ont été observées pendant le traitement par le Ruxolitinib chez les patients atteints de RS-GVHD. L'efficacité du Ruxolitinib a donc été prouvée notamment en mettant en évidence ses puissantes propriétés anti-inflammatoires et pourrait donc constituer une nouvelle option thérapeutique prometteuse pour les RS-GVHD (Zeiser *et al.*, 2015). Ensuite, R. Zeiser et son équipe ont réalisé un essai de phase III multicentrique et randomisé (NCT02913261) dans le but de comparer l'efficacité et la sécurité du Ruxolitinib oral (10 mg deux fois par jour) par rapport au traitement standard choisi par l'investigateur parmi une liste de neuf options couramment utilisées (contrôle) chez des patients âgés de 12 ans ou plus ayant présenté une RS-GVHD aiguë après une greffe de CSH. Le critère d'évaluation principal était l'ORR (complète ou partielle) au 28^e jour et au 56^e jour. Au total, 309 patients ont été randomisés ; 154 patients ont été assignés au groupe Ruxolitinib et 155 au groupe contrôle. L'ORR au 28^e jour était plus élevée dans le groupe traité par Ruxolitinib que dans le groupe contrôle (62% contre 39%). L'ORR au 56^e jour était également plus élevée dans le groupe traité par Ruxolitinib que dans le groupe contrôle (40% contre 22%). La survie médiane sans rechute a été considérablement plus longue avec le Ruxolitinib qu'avec le groupe contrôle (5 mois contre 1 mois). La médiane de survie globale était de 11,1 mois dans le groupe traité par Ruxolitinib et de 6,5 mois dans le groupe contrôle. Les effets indésirables les plus fréquents jusqu'au 28^e jour étaient la thrombocytopénie (33% dans le groupe Ruxolitinib et 18% dans le groupe contrôle), l'anémie (30% dans le groupe Ruxolitinib et 28%

dans le groupe contrôle) et l'infection par le CMV (26% dans le groupe Ruxolitinib et 21% dans le groupe contrôle). Le Ruxolitinib s'avère donc être une thérapie efficace contre la GVHD. Effectivement, il a permis d'obtenir des améliorations significatives en termes d'efficacité même s'il présente, néanmoins, une incidence plus élevée de thrombocytopénie ainsi qu'une réactivation du CMV (Zeiser *et al.*, 2020). A partir de cette étude de phase III, le Ruxolitinib a été reconnu comme traitement standard de la GVHD aiguë réfractaire.

Le Baricitinib est un inhibiteur de JAK1/2 utilisé dans le cadre de la prévention de la GVHD aiguë. Il a été initialement conçu pour le traitement des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, il a été rapporté qu'il pouvait également prévenir la GVHD. Bien que le Baricitinib possède une action similaire au Ruxolitinib dirigée contre JAK1/2, il présente une meilleure prévention de GVHD chez la souris par rapport à ce dernier, ceci est dû à une augmentation associée des Tregs ainsi que de pSTAT5. En effet, la survie et la prolifération des Tregs nécessitent une activation de la signalisation JAK1/3 et de STAT5 qui est dépendante de l'IL2R. Or, étant donné que JAK3 n'est pas ciblé par le Baricitinib et que cette voie de signalisation est essentielle pour l'augmentation des Tregs après une allo-HSCT, il semblerait qu'in fine, il y ait une meilleure prévention de la GVHD avec ce traitement (Kim *et al.*, 2022). L'étude *in vivo* sur souris menée par S. Kim et son équipe a démontré une amélioration significative de la prise de greffe avec un chimérisme complet du

donneur dans les groupes traités par Baricitinib par rapport au groupe témoin ainsi qu'une meilleure récupération des cellules sanguines (globules blancs, lymphocytes et plaquettes), une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires et donc, in fine, du développement de la GVHD (Kim *et al.*, 2022). Une autre étude menée par J. Choi et son équipe a été réalisée *in vivo* pour tester le Baricitinib comme traitement de la GVHD. Pour ce faire, le Baricitinib a été administré d'une part à 200 µg/jour et d'autre part à 400 µg/jour aux souris, une fois seulement la GVHD étant cliniquement apparente (jour 10 post-xénogreffe). La survie globale observée a été de 100% et les scores cliniques de GVHD ont été réduits. Au 27^e jour, il a été démontré que la dose la plus élevée de Baricitinib a entraîné une récupération nettement améliorée du nombre de cellules sanguines (globules blancs, lymphocytes et plaquettes), un chimérisme complet du donneur et une augmentation du nombre de Tregs en préservant la voie de signalisation JAK3/STAT5 qui est régulée à la baisse par l'expression de CXCR3 ainsi que par les Th1 et les Th2 et ce, tout en préservant la prolifération des lymphocytes T activés par les CPA. Concernant l'effet GvL, le Baricitinib semble conserver cet effet. Celui-ci a été évalué grâce à l'injection de cellules A20 en même temps que des cellules provenant de la moelle osseuse appauvries en lymphocytes T à des souris BALB/c irradiées. Onze jours plus tard, le temps que la leucémie se développe, les souris ont subi une infusion retardée de lymphocytes T du donneur (donneur lymphocyte infusion – DLI). Les résultats obtenus ont démontré que le Baricitinib seul (en l'absence de lymphocytes T du donneur)

n'avait pas inhibé la croissance tumorale. Par contre, le Baricitinib a renforcé les effets GvL, c'est-à-dire une diminution significative de la charge tumorale leucémique pour les souris ayant reçu les lymphocytes T du donneur en plus du Baricitinib par rapport aux souris contrôle n'ayant reçu que les cellules A20 avec les lymphocytes T du donneur sans traitement. Dès lors, ils ont mis en évidence que le Baricitinib permettait de réduire l'expression du CMH de type II, de CD80/86 et de PD-L1 sur les CPA de l'hôte. De manière remarquable, le Baricitinib renforce donc les effets GvL et ce, en réduisant l'expression de PD-L1 dans la tumeur (cellules A20). Ces observations indiquent que l'utilisation d'inhibiteurs de JAK1/2 tel que le Baricitinib dans la prophylaxie de la GVHD pourrait donc constituer une stratégie visant à réduire la nécessité d'agents immunosuppresseurs potentiellement responsables de la rechute de la maladie, de la morbidité et de la mortalité après une HSCT (Choi *et al.*, 2018). Par la suite, une étude clinique de phase I a été réalisée par M. Schroeder et son équipe regroupant 24 patients traités par Baricitinib soit 2mg ou soit 4mg (n=12/cohorte) par voie orale quotidiennement du jour -3 au jour +100 HSCT, suivi d'une réduction progressive de ce traitement. Tous les sujets ont donc reçu une prophylaxie standard pour le traitement de la GVHD avec du Tac et du mini-MTX +/- Thymoglobuline (n=19) ou du PTCy post-transplantation avec du MMF et du Tac (n=5). La mortalité liée au traitement au jour 180 était de 8%. L'incidence globale de développer une GVHD aiguë de grade III - IV à tout moment était de 12,5% (deux de ces cas sont survenus après l'arrêt du Baricitinib). Le seul cas de GVHD aiguë de grade III qui a été observé au jour

21 (cohorte 4 mg) était une GVHD localisée dans la partie inférieure du tube gastro-intestinal mais répondant aux stéroïdes et qui n'est pas réapparue avec la diminution de l'immunosuppresseur et l'arrêt de Baricitinib. Une GVHD de grade II - IV est survenue dans 33% des cas. Deux cas étaient réfractaires aux stéroïdes (un dans la cohorte 2 mg et un dans la cohorte 4 mg). Tous les cas rapportés de GVHD aiguë de grade II ont répondu aux stéroïdes. Par contre, tous les sujets de la cohorte 4mg de cette étude ont présenté une embolie pulmonaire. L'incidence de la rechute de la maladie à un an était de 21% avec 2 rechutes dans la cohorte 2 mg et 3 dans la cohorte 4 mg. La survie globale à un an était de 70%. La survie sans rechute de la GVHD à un an était de 33%. In fine, le Baricitinib utilisé dans le cadre d'une allogreffe HLA appariées a permis de contrôler le développement de la GVHD. Effectivement, les patients de cette étude ont présenté de faibles taux de GVHD aiguë de grade III/IV pendant ce traitement (Schroeder *et al.* 2022). Par contre, contrairement au Ruxolitinib, le Baracitinib n'est pas utilisé en clinique dans le cadre de la prévention de la GVHD en post-greffe à l'exception de quelques études dont certaines présentées ci-dessus.

L'Itacitinib est un inhibiteur de JAK1 qui lorsque j'ai commencé ma thèse était en étude clinique comme traitement de première ligne de la GVHD aiguë en association avec les corticostéroïdes (étude GRAVITAS-301). Les résultats de cette étude seront discutés dans la partie conclusion de ma thèse (cfr pages 178-182).

Le Pacritinib est un inhibiteur de JAK2 utilisé dans le cadre de la prévention de la GVHD. Chez la souris, J. Pidala et son équipe ont étudié l'impact du Pacritinib sur la GVHD xénogénique. Ils ont mis en évidence qu'une dose de 100mg/kg deux fois par jour supprimait les lymphocytes T alloréactifs humains. Ensuite, ils ont étudié l'effet du Pacritinib en association avec le Sirolimus (inhibiteur de mTOR) afin de bloquer JAK2/STAT3 et mTOR démontrant ainsi une réduction significative de la fréquence des lymphocytes T CD4+, des Th1 et des Th17 ainsi qu'une réduction des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN- γ , IL-13, GM-CSF. A l'inverse, une augmentation significative de la fréquence des Tregs a été observée. In fine, une double inhibition JAK2/mTOR permet donc de réduire significativement la GVHD xénogénique et, en parallèle, permettait d'augmenter les Tregs. Ensuite, cette même équipe a réalisé une étude clinique de phase I (NCT02891603) où le Pacritinib a été combiné avec du Sirolimus et du Tac à faible dose dans le but de prévenir la GVHD chez 12 patients ayant subi une allo-HSCT HLA-matchée ou non-apparentée. Le but de cette étude est de déterminer la dose minimale biologiquement active et sûre de Pacritinib. Deux doses ont été testées à savoir 100mg une fois par jour et 100mg deux fois par jour. C'est cette dernière qui a été identifiée comme meilleure lors de cette étude. L'administration de cette combinaison médicamenteuse implique une inhibition de JAK2/mTOR entraînant une diminution des Th1 et des Th17 tout en épargnant les Tregs et les lymphocytes T CD8+ effecteurs anti-leucémiques et les cellules NK. En effet, l'activité de JAK2/STAT3 est le médiateur de la signalisation des récepteurs de l'IL-6, de l'IL-

12 et de l'IL-23 et donc de la différenciation en Th1 et Th17 qui s'ensuit. C'est donc via ce mécanisme d'action que la GVHD aiguë peut être contrôlée. De plus, il a été rapporté que l'administration de Pacritinib-Sirolimus-Tac permettait de préserver l'immunité du donneur contre le CMV ainsi qu'une prise de greffe rapide sans cytopénie. En conclusion, cette étude a permis de démontrer que l'association Pacritinib-Sirolimus-Tac est sûre dans le cadre de la prévention de la GVHD (Pidala *et al.*, 2021). Sur la base de la réussite de cet essai de phase I Pacritinib-Sirolimus-Tac, il a été démontré que le blocage de JAK2/mTOR renforçait la population des Tregs. Cette découverte justifie davantage l'association Pacritinib-Sirolimus-Tac pour permettre une allo-tolérance sans contrainte. De plus, le Pacritinib inhibe JAK2 sans affecter JAK1, ce qui évite la suppression de l'IL-2 nécessaire aux Tregs.

Une étude de phase II (NCT02891603) a donc été réalisée sur l'utilisation de Pacritinib-Sirolimus-Tac après une allogreffe appariée 8/8-HLA. Malheureusement, cette étude n'a pas été concluante malgré que l'association de Pacritinib-Sirolimus-Tac ait réussi à réduire la pSTAT3, à augmenter la pSTAT5 et à supprimer les Th1 et Th17, le régime, in fine, n'a pas réduit le risque de GVHD aiguë. Les essais de phase II ont révélé une déconnexion biologique entre le blocage efficace de l'axe IL-6/JAK2/pSTAT3 et l'absence décevante d'amélioration clinique dans la prévention de la GVHD aiguë. Il a été supposé que l'activité incontrôlée de l'Aurora kinase A des cellules T a contribué au développement de la GVHD aiguë par le biais de la co-stimulation du CD28 (Pidala *et al.* 2023).

4. L'effet greffe contre la tumeur (GvT)

C'est en 1957 que l'effet GvT ou également appelé greffe contre la leucémie (GvL) a été décrit pour la première fois par W. H. Barnes et J. F. Loutit. Ils ont observé que les cellules leucémiques étaient éradiquées chez les souris ayant reçu une irradiation suivie d'une greffe de moelle osseuse allogénique contrairement aux souris ayant reçu une greffe de moelle osseuse syngénique (Barnes *et al.*, 1956; Barnes and Loutit, 1957). L'importance de l'effet GvL chez l'homme a été confirmée 20 ans plus tard par P. Weiden et son équipe qui ont mis en évidence un risque de rechute plus faible chez les patients ayant développé une GVHD après une HSCT (Weiden *et al.*, 1979). Ce phénomène a été confirmé par la suite dans la majorité des contextes de transplantation que ce soit en termes d'allogreffe avec un conditionnement non myéloablatif ou de transplantation de sang de cordon (Baron *et al.*, 2005, 2018). D'autres études ont également confirmé l'impact majeur de l'effet GvL en observant des risques plus élevés de rechute chez les receveurs de greffes de jumeaux génétiquement identiques contrairement aux greffes de frères et sœurs HLA-identiques ainsi que chez les patients recevant des greffes appauvries en lymphocytes T (Horowitz *et al.*, 1990). L'effet GvT représente donc un évènement important dans le contexte de la HSCT pour le traitement de tumeurs malignes. Ce processus est médié par les lymphocytes T effecteurs alloréactifs du donneur dont le rôle dans la régression tumorale est clairement établi. Plusieurs observations appuient cette notion, notamment la nécessité de conserver les

lymphocytes T du donneur dans le greffon pour observer l'effet GvT. De plus, en cas de rechute de la leucémie après une allogreffe, les transfusions de lymphocytes T du donneur peuvent induire des rémissions durables chez certains patients (Kolb *et al.*, 2004).

Chez les patients atteints de leucémie ou de lymphomes à progression rapide, la croissance de la tumeur peut dépasser le développement des cellules T effectrices. Dans ce cas précis, il peut être préférable de sélectionner des donneurs présentant des incompatibilités HLA pour la HSCT ce qui permettrait aux cellules NK alloréactives (missing-self), qui apparaissent plus rapidement après la transplantation, de conserver leur fonction cytolytique (Kolb *et al.*, 2004).

Afin d'évaluer l'importance de l'effet GvL dans la prévention des rechutes de leucémie après une greffe de moelle osseuse, M. Horowitz et son équipe ont étudié cet effet chez 2254 patients ayant reçu des greffes de moelle osseuse HLA identiques dans le cadre d'une leucémie. Quatre groupes ont été étudiés :

- les receveurs d'allogreffes non déplétées en cellules T sans GVHD,
- les receveurs d'allogreffes non déplétées en cellules T avec GVHD,
- les receveurs d'allogreffes déplétées en cellules T
- les receveurs de greffes de jumeaux génétiquement identiques.

Une diminution des rechutes a été observée chez les receveurs d'allogreffes non déplétées en cellules T présentant une GVHD

aiguë et chronique par rapport aux receveurs d'allogreffes non déplétées en cellules T ne présentant pas de GVHD. Ces données confirment donc bien l'effet anti-leucémique associé à la GVHD. Concernant les greffes de jumeaux identiques, la probabilité de rechute était accrue par rapport aux receveurs d'allogreffes sans GVHD. Ces données confirment donc l'effet anti-leucémique des greffes allogéniques indépendamment de la GVHD. Les patients ayant reçu des greffes avec déplétion des lymphocytes T avec ou sans GVHD avaient des probabilités plus élevées de rechute que les receveurs d'allogreffes sans déplétion des lymphocytes T sans GVHD. Ces données confirment ainsi l'existence d'un effet anti-leucémique indépendant de la GVHD mais modifié par la déplétion en lymphocytes T. Ces résultats expliquent l'efficacité de la transplantation allogénique de moelle osseuse dans le cadre de l'éradication de la leucémie et fournissent des preuves du rôle du système immunitaire dans le contrôle des cancers humains. Les probabilités de rechute de la leucémie après une greffe de moelle osseuse selon le type de greffe et selon l'évolution de la GVHD sont représentées dans la figure 18 (Horowitz *et al.*, 1990).

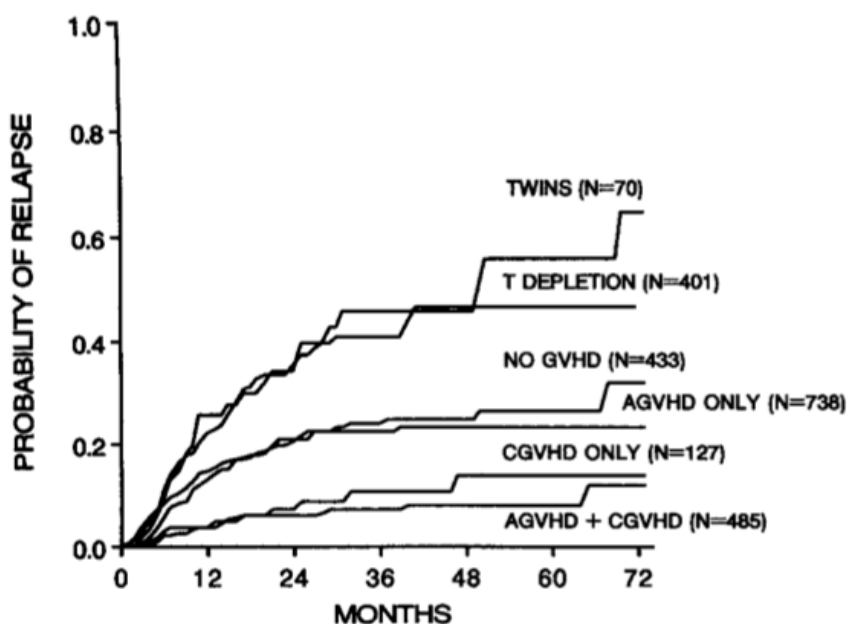


Figure 18. Probabilités de rechute de la leucémie après une greffe de moelle osseuse selon le type de greffe et l'évolution de la GVHD. Les receveurs présentant une GVHD aiguë uniquement, une GVHD chronique uniquement ou les deux avaient des probabilités de rechute à 3 ans de 22%, 10% et 7%, respectivement. Les receveurs de greffes de jumeaux identiques avaient une probabilité de rechute à 3 ans de 46%. Les receveurs de greffes déplétées en cellules T avaient une probabilité de rechute à 3 ans de 41%. Figure venant de (Horowitz *et al.*, 1990).

Ces résultats ont été confirmés par d'autres études qui renforcent l'importance des effets GvL indiquant effectivement des risques de rechute accrus chez les receveurs de greffes de jumeaux génétiquement identiques par rapport à ceux recevant des greffes de frères et sœurs HLA-identiques, ainsi que chez ceux recevant des greffes déplétées en lymphocytes T (Stadler *et al.*, 2023).

Le mécanisme sous-jacent à l'effet GvT implique les lymphocytes T CD8+ qui libèrent des molécules effectrices endommageant les tumeurs et induisant leur apoptose. Ces molécules incluent la

perforine et la granzyme, agissant en paracrine pour exercer leur effet cytotoxique sur les cellules tumorales. L'interaction des récepteurs des lymphocytes T avec les antigènes spécifiques, soit des antigènes mineurs d'histocompatibilité (mHA) soit des antigènes spécifiques aux tumeurs, présentés par le CMH de classe I sur la surface des cellules tumorales, est cruciale pour initier ces voies effectrices (Figure 19). En effet, en plus des mHA, les lymphocytes T allogéniques peuvent également reconnaître des épitopes associés au CMH codés par des gènes qui sont exprimés de manière aberrante dans les cellules leucémiques tels que la protéinase-3, WT1 (oncoprotéine de la tumeur de Wilms), CT-RCC (cellules d'un type spécifique d'un carcinome rénal), HERV-E (rétrovirus endogène humain) ainsi que les membres de la famille MAGE (McLarnon *et al.*, 2010; A.G. Chapuis *et al.*, 2019; Barisic and Childs, 2022).

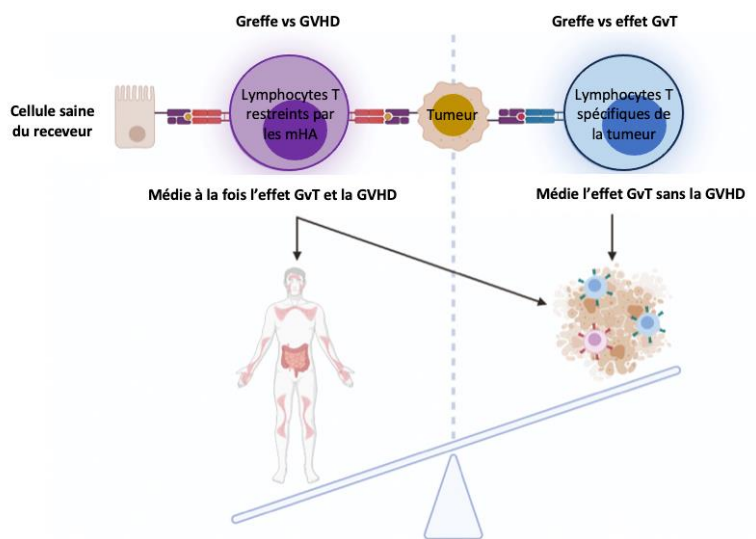


Figure 19. Interaction complexe des lymphocytes T du donneur : entre GVHD, GvT et reconnaissance tumorale. Les lymphocytes T du donneur médient l'effet de la GVHD et/ou l'effet GvT. Les lymphocytes T du donneur

réactifs contre la tumeur reconnaissent les antigènes présentés sur les cellules tumorales dans le contexte des HLA. Ces antigènes proviennent soit des mHA soit des antigènes spécifiques à la tumeur. Alors que les mHA peuvent être des substrats d'un effet GvT médié par les lymphocytes T restreints par les mHA, ces mêmes lymphocytes T reconnaissent également les mHA similaires présents sur les tissus normaux, provoquant ainsi la GVHD. Une régression tumorale sans apparition manifeste de GVHD peut être obtenue grâce aux lymphocytes T reconnaissant des antigènes spécifiques à une tumeur (lymphocytes T restreints à la tumeur). Figure adaptée de (Barisic and Childs, 2022).

L'étude menée par L. Vago et son équipe a révélé que parmi les 17 patients ayant subi une HSCT, 5 ont présenté une rechute. Des variants mutants de cellules leucémiques ont été identifiés chez ces patients. Ces variants se caractérisent par la perte de l'haplotype HLA non apparié avec celui du donneur, résultant d'une disomie uniparentale acquise du chromosome 6p. De manière significative, les lymphocytes T du donneur après la transplantation n'ont pas reconnu les cellules leucémiques mutantes tandis que les cellules leucémiques originales prélevées au moment du diagnostic ont été efficacement identifiées et éliminées. Ces résultats suggèrent que suite à une transplantation de CSH haplo-identiques et la perfusion de cellules T de donneur, les cellules leucémiques peuvent échapper à la surveillance immunitaire anti-leucémique du donneur en perdant l'haplotype HLA non apparié ce qui conduit à la rechute de la maladie (Vago *et al.*, 2009). Cette stratégie d'évasion tumorale offre donc une protection contre les lymphocytes T alloréactifs. De plus, les blastes leucémiques peuvent diminuer l'expression des molécules du CMH de classe II, entravant ainsi leur reconnaissance par les lymphocytes T CD4+ du donneur. Ces adaptations soulignent la complexité des interactions entre le système

immunitaire et les cellules leucémiques ce qui impacte les résultats des HSCT (Rovatti *et al.*, 2020).

In fine, l'allogreffe de CSH est le traitement le plus efficace pour certains patients atteints de leucémie, reposant sur l'effet GvL où les lymphocytes T du donneur contrôlent la croissance des cellules malignes. Cependant, malgré les avancées, la rechute persiste en tant que principale cause de décès après une allo-HSCT ce qui en fait un défi thérapeutique majeur. Pour mieux approfondir notre compréhension de ces phénomènes, V. Gournay et son équipe ont caractérisé les leucocytes circulants dans deux cohortes de patients ayant subi une allo-HSCT. Les analyses ont révélé des altérations profondes de l'équilibre immunitaire persistant un an après l'HSCT par rapport aux individus sains. De manière significative, des niveaux élevés d'expression de TIGIT (récepteur immunitaire des lymphocytes T avec des domaines Ig et ITIM) et de CD161 sur les lymphocytes T CD4+ ont été identifiés au troisième mois après l'HSCT et sont considérés comme étant associés à une rechute de la maladie. Cette observation suggère que la perte de l'effet GvL pourrait être attribuable, dans certains cas, à une altération des lymphocytes T du donneur ayant un impact sur le pronostic de la maladie. Par conséquent, bien que le blocage de PD-1 soit l'immunothérapie la plus couramment utilisée à ce jour, il serait envisageable de cibler TIGIT et CD161 dans ce même contexte. Toutefois, il est important de noter que l'utilisation d'anticorps bloquant les points de contrôle immunitaires peut entraîner une exacerbation de la GVHD. Ainsi, des stratégies thérapeutiques

innovantes pourraient être nécessaires pour cibler sélectivement les lymphocytes T alloréactifs spécifiques de la tumeur qui n'attaqueraient pas les tissus sains (Gournay *et al.*, 2022).

En outre, il est important de noter que l'effet GvL ne dépend peut-être pas uniquement des lymphocytes T du donneur, car des études suggèrent que les cellules NK du donneur jouent un rôle significatif dans ce mécanisme. Cette implication est particulièrement évidente chez les patients traités pour la leucémie myéloïde aiguë avec des greffes déplétées en lymphocytes T provenant de donneurs haplo-identiques (Velardi, Ruggeri and Mancusi, 2012). Cependant, la contribution des cellules NK du donneur dans le contexte de la HSCT suscite encore des débats (Ruggeri *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2019).

En conclusion, l'effet GvT représente un mécanisme puissant et complexe qui nécessite une compréhension approfondie pour améliorer l'efficacité des traitements par HSCT dans le contexte des tumeurs malignes.

5. Rôle de l'interleukine-15

Des souris déficientes en IL-15R α (IL-15R α /-) ont été créées pour comprendre le rôle de l'IL-15R α dans le développement et la fonction immunitaires. Les souris IL-15R α /- présentent une lymphopénie malgré un développement des lymphocytes T et B manifestement normal. La lymphopénie observée est causée par une réduction de la prolifération et du cheminement des

lymphocytes vers les ganglions lymphatiques périphériques. Ces souris sont également déficientes en cellules NK, en cellules NKT, en lymphocytes T CD8⁺ et en lymphocytes intra-épithéliaux TCR $\gamma\delta$. En outre, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ mémoires est significativement réduit. L'absence d'IL-15 ou de son récepteur peut donc conduire à une dysrégulation de la réponse immunitaire augmentant ainsi la susceptibilité aux infections virales et bactériennes. Ainsi, l'IL-15R α joue un rôle pléiotrope dans le développement et la fonction immunitaire, y compris dans le maintien positif de l'homéostasie lymphocytaire. Ces observations soulignent donc l'importance de l'IL-15 dans la réponse immunitaire et la surveillance anti-tumorale (Lodolce *et al.*, 1998). En effet, l'IL-15 est une cytokine pro-inflammatoire qui occupe une place centrale dans la régulation du système immunitaire en participant au développement, à la survie, à la prolifération et à l'activation des cellules immunitaires, notamment des lymphocytes T et particulièrement des lymphocytes T CD8⁺ mémoires et des cellules NK (Leonard, Lin and O'Shea, 2019). De plus, il a également été rapporté que l'IL-15 joue un rôle dans le développement des Tregs même si l'IL-2 est reconnue comme le moteur le plus important dans le développement et la survie des Tregs (Waldmann, 2006; Owen *et al.*, 2018). Au-delà de son rôle immunitaire, l'IL-15 est exprimée dans divers tissus et types cellulaires dont le placenta, le muscle squelettique, le rein, le poumon, le cœur, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules nerveuses, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques suggérant

des fonctions potentielles également au sein de ceux-ci (Secombes, Wang and Bird, 2016).

L'IL-7, quant à elle, est une cytokine essentielle pour le développement des lymphocytes T ainsi que pour leur survie et leur homéostasie. Elle joue un rôle important à plusieurs étapes du développement des lymphocytes T, depuis leur maturation dans le thymus jusqu'à leur maintien en périphérie (Mazzucchelli and Durum, 2007)(Mazzucchelli and Durum, 2007).

En condition lymphopénique, l'IL-7 est indispensable pour la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs et mémoires. L'IL-7 agit en se liant à son récepteur spécifique, composé des chaînes IL-7R α et γ c, ce qui active les voies de signalisation JAK-STAT et PI3K/Akt, favorisant ainsi la survie et la prolifération des lymphocytes T (Ziegler and Liu, 2006). L'absence de signalisation par l'IL-7 entraîne une absence de lymphocytes T, lymphocytes B et de cellules NK dans les modèles animaux déficients pour cette cytokine (Von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2021).

L'IL-7 joue un rôle complexe dans le contexte de la HSCT allogénique. D'une part, elle est impliquée dans l'amplification des réponses alloréactives des lymphocytes T, ce qui peut aggraver la gravité de la GVHD. D'autre part, des investigations dans des modèles murins de GVHD indiquent que l'administration d'IL-7 après une greffe allogénique peut accélérer la reconstitution des lymphocytes T non-alloréactifs sans avoir d'impact significatif sur les lymphocytes T alloréactifs et, ainsi, améliorer les populations

cellulaires essentielles, sans exacerber la GVHD (Alpdogan *et al.*, 2003).

En somme, bien que l'IL-15 soit reconnue pour sa capacité à promouvoir la survie et la prolifération des cellules T CD8+ et des cellules NK, l'IL-7 joue un rôle complémentaire et parfois redondant dans le maintien des lymphocytes T, particulièrement dans des contextes de stress immunitaire tel que la GVHD. Les deux cytokines sont donc cruciales pour la régulation de la prolifération homéostatique des lymphocytes T et pour le développement de réponses immunitaires adaptées.

5.1 Effet de l'IL-15 sur le système immunitaire

L'IL-15 joue un rôle dans la régulation du système immunitaire en influençant diverses cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Concernant les cellules NK, l'IL-15 est indispensable pour leur développement, leur différenciation et leur survie jouant ainsi un rôle clé dans la défense immunitaire contre les infections virales, bactériennes et tumorales. Bien que les cellules NK ne produisent pas l'IL-15, elles expriment des récepteurs spécifiques à cette cytokine, nécessaires à leur développement et leur maintien. L'IL-15 stimule également la production de sous-populations spécifiques de cellules NK, favorisant la production d'IFN- γ et modulant leur cytotoxicité (Lodolce *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2023). En ce qui concerne les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, ils répondent à l'IL-15 en exprimant des cytokines pro-

inflammatoires, modulant ainsi la réponse immunitaire. L'IL-15 favorise la migration des neutrophiles et des monocytes vers les sites d'infection. Les cellules dendritiques produisent de l'IL-15 en réponse à divers stimuli ce qui améliore leur capacité à stimuler les lymphocytes T et influence la réponse immunitaire adaptative (Saikh *et al.*, 2001).

Les neutrophiles, quant à eux, sont les premières cellules immunitaires à répondre à l'infection et ils expriment également des récepteurs pour l'IL-15. En réponse à cette cytokine, ils modifient leur cytosquelette, prolongent leur survie et induisent la production de chimiokines pour recruter d'autres cellules immunitaires (Perera *et al.*, 2012).

Les mastocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire contre divers agents pathogènes et ils répondent à l'IL-15 en proliférant ainsi qu'en régulant la survie cellulaire. Cette cytokine exerce un contrôle négatif sur la transcription d'une chymase mastocytaire. Cette enzyme participe activement aux réponses antibactériennes en dégradant les composants des agents pathogènes. En se liant à son récepteur spécifique sur la membrane cellulaire des mastocytes, l'IL-15 déclenche des cascades de signalisation telles que la voie JAK-STAT et la voie PI3K-Akt. Ces voies activées entraînent la phosphorylation de facteurs de transcription inhibiteurs ou activent des mécanismes épigénétiques qui inhibent l'activation du promoteur de la chymase mastocytaire. Cette régulation fine permet à l'organisme de moduler efficacement ses réponses

immunitaires spécifiquement contre les agents pathogènes bactériens, soulignant le rôle de l'IL-15 dans le cadre de l'immunité adaptative (Solimando, Desantis and Ribatti, 2022).

Le développement et la prolifération des NKT dépendent également de l'IL-15 soulignant ainsi le rôle de cette cytokine dans la réponse immunitaire innée (Gordy *et al.*, 2011).

Concernant les lymphocytes T, l'IL-15 est déterminante pour le maintien des lymphocytes T CD8+ mémoires (TCM et TEM), favorisant leur survie et leur prolifération. Elle joue également un rôle dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ mémoires et modifie la réponse immunitaire des lymphocytes T CD4+ et CD8+ en régulant leur activation, leur prolifération et leur capacité cytotoxique ce qui impacte ainsi la réponse immunitaire liée à l'âge. De plus, l'IL-15 stimule la libération de cytokines, notamment l'IFN- γ renforçant ainsi la réponse immunitaire de type Th1 (Cai *et al.*, 2023).

Bien que les lymphocytes B ne produisent pas directement d'IL-15, cette cytokine peut co-stimuler leur prolifération en réponse à certains stimuli. De plus, l'IL-15, produite par les cellules dendritiques folliculaires, favorise la survie et la prolifération des lymphocytes B dans les centres germinaux contribuant ainsi à la production d'anticorps de haute affinité (Perera *et al.*, 2012).

En résumé, l'IL-15 émerge comme un régulateur central du système immunitaire, coordonnant les réponses des cellules immunitaires

innées et adaptatives pour assurer une défense efficace contre les infections et les cellules cancéreuses tout en influençant la mémoire immunitaire ainsi que la réponse inflammatoire (Sindaco *et al.*, 2023).

5.2 Effet de l'IL-15 en post-greffe

Un aspect particulièrement notable de l'IL-15 réside dans son implication dans la réponse immunitaire anti-tumorale. En favorisant la réponse des lymphocytes T CD8+ dirigée contre les cellules cancéreuses, elle contribue à l'effet GvT dans le cadre des HSCT (Ma, Caligiuri and Yu, 2022). Ce processus s'explique par la capacité de l'IL-15 à agir sur la régulation de la transcription, de la traduction, de la translocation et du trafic intracellulaire favorisant ainsi la production et la fonctionnalité de ces cellules immunitaires essentielles.

En effet, C. Sauter et son équipe ont démontré que l'administration d'IL-15 après la transplantation améliorerait significativement la reconstitution immunitaire, en particulier les populations des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK dérivées du donneur dans des modèles expérimentaux murins. De plus, l'effet GvT était également significativement augmenté améliorant ainsi la survie sans augmenter la GVHD. Cet effet a été observé lorsque l'administration d'IL-15 avait eu lieu à un moment ultérieur plutôt qu'immédiatement après la transplantation permettant ainsi probablement une plus grande prise de greffe des cellules du

donneur et une plus grande prolifération des lymphocytes T. A contrario, l'administration d'IL-15 sans perfusion de lymphocytes T n'a pas entraîné d'amélioration de la survie (Sauter *et al.*, 2012).

Plusieurs études sur souris ont donc permis d'arriver à la conclusion suivante : l'IL-15 augmente le nombre et la fonction des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK. Cependant, l'utilisation thérapeutique de l'IL-15 se heurte encore à des obstacles vu sa faible puissance et sa courte demi-vie *in vivo*. Pour y remédier, C. Bailey et son équipe ont étudié un nouveau complexe superagoniste de l'IL-15, l'IL-15SA. Celui-ci présente une demi-vie sérique nettement plus longue et une activité *in vivo* accrue contre diverses tumeurs. Il a été rapporté que l'administration hebdomadaire d'IL-15SA aux receveurs de greffe de CSH allogéniques augmentait bel et bien de manière significative le nombre de lymphocytes T CD8+ mémoires et de cellules NK. Le groupe traité par l'IL-15SA présentait une sécrétion intracellulaire d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T CD8+ augmentée. L'IL-15SA a également été évaluée dans le cadre de son activité antitumorale contre le lymphome murin à cellules B (A20). De ces observations, il a été conclu que l'IL-15SA renforce l'effet GvT. Il est également intéressant de noter que l'administration d'IL-15SA a permis une activité GvT sans augmenter la GVHD. En conclusion, l'IL-15SA pourrait être un facteur de croissance lymphoïde des lymphocytes T très puissant et un nouvel agent immunothérapeutique pour compléter la transplantation de CSH et l'immunothérapie adoptive (Bailey *et al.*, 2017).

En revanche, à l'inverse, S. Roychowdhury et son équipe ont démontré que l'IL-15 exacerbait la GVHD xénogénique chez les souris recevant des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs). En effet, les souris traitées par l'IL-15 ont présenté une létalité rapide ainsi qu'une expansion des lymphocytes T CD4+ et CD8+ humains par rapport aux témoins et des infiltrations lymphocytaires dans le foie, les poumons et la rate correspondant aux caractéristiques d'une GVHD xénogénique (Roychowdhury *et al.*, 2005).

Une autre étude menée par Y. Zhou et son équipe a démontré que l'IL-15 avait bel et bien un effet anti-tumoral puissant mais que son utilisation entraînait une expansion excessive des cellules NK chez les souris traitées pouvant potentiellement conduire à la mortalité de ces souris. Ces résultats suscitent donc des préoccupations quant à la sécurité des cellules immunitaires activées par l'IL-15 dans le contexte de la thérapie cellulaire (Zhou *et al.*, 2022).

De plus, les résultats de l'étude menée par B. Blaser et son équipe indiquent que l'absence d'IL-15 conduit à une atténuation de la GVHD aiguë. Cette constatation conduit à la conclusion que l'IL-15 dérivée du donneur joue un rôle en tant que médiateur dans la fonction des lymphocytes T lors de la GVHD aiguë (Blaser *et al.*, 2005).

Effectivement, afin d'établir une corrélation entre les niveaux de cytokines sériques et le développement de la GVHD, K. Chik et son

équipe ont mené une étude prospective sur les mesures de l'IFN- γ , de l'IL-10, de l'IL-12 et de l'IL-15. Les cytokines ont été mesurées chez 27 sujets par dosage immuno-enzymatique pendant les deux premiers mois suivant la transplantation de CSH. Les 19 sujets atteints de GVHD aiguë présentaient des valeurs en IFN- γ et en IL-15 significativement plus élevées qu'au début du conditionnement. Cette augmentation a été observée peu de temps après la greffe de CSH pour revenir à un niveau basal au cours du deuxième mois post-transplantation. En revanche, il y avait moins de différence entre les taux sériques d'IFN- γ , d'IL-10 et d'IL-15 et leur taux de base chez les 8 sujets n'ayant pas développé de GVHD. Le pic sérique d'IL-15 était en outre significativement plus élevé chez les sujets atteints de GVHD que chez ceux sans GVHD au cours du premier mois suivant la transplantation. Cependant, le niveau d'IL-15 n'a montré aucune corrélation avec la sévérité de la GVHD. Ces changements indiquent un rôle possible de la sécrétion systémique de cytokines dans le développement de la GVHD aiguë. Des taux élevés d'IL-15 au début de la période post-transplantation pourraient néanmoins être un marqueur prédictif de la GVHD aiguë (Chik *et al.*, 2003).

De ce fait, l'IL-15 a montré un potentiel significatif dans l'immunothérapie du cancer en renforçant l'effet GvT en favorisant le développement de cellules T CD8+ mémoires. L'administration d'IL-15 ou d'agonistes de l'IL-15 après une greffe de CSH est une stratégie qui a pour but d'améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire et de réduire les effets secondaires. Les agonistes de

l'IL-15 sont conçus pour cibler spécifiquement le microenvironnement tumoral ou des cellules immunitaires spécifiques afin de réduire la toxicité systémique. Lorsqu'ils sont administrés directement à l'intérieur de la tumeur, il y a une augmentation de leur efficacité car il y a une action plus directe sur les cellules tumorales. Cette approche peut donc surmonter les limitations liées à la pénétration des cellules immunitaires dans la tumeur et favoriser des effets antitumoraux plus cohérents. Malgré les résultats prometteurs observés dans plusieurs études précliniques et cliniques, des défis subsistent, notamment en ce qui concerne la sécurité et l'efficacité clinique. En effet, l'administration d'IL-15 ou d'agonistes de l'IL-15 après une transplantation de CSH peut entraîner plusieurs effets secondaires tels qu'une réaction allergique, un syndrome grippal, de la fatigue, des troubles gastro-intestinaux, une augmentation de la pression artérielle, des risques d'hyperactivation immunitaire pouvant conduire à des réponses inflammatoires incontrôlées et des complications telles que la réactivation de maladies auto-immunes ou la survenue de la GVHD. Des recherches supplémentaires sont donc encore nécessaires pour optimiser les schémas posologiques et réduire les effets secondaires afin de maximiser le potentiel thérapeutique de l'IL-15 dans le traitement du cancer (Cai *et al.*, 2023).

Dans le cadre de la leucémie myéloïde aiguë (LMA), il a été observé que le Sorafenib, un inhibiteur de tyrosine kinase à cibles multiples, augmentait la production d'IL-15 par les cellules leucémiques FLT3-ITD+ *in vivo*. Cette action a été synergique avec la réponse des

lymphocytes T CD8+ alloréactifs ce qui a permis une survie à long terme. En effet, la production d'IL-15 liée au Sorafénib a entraîné une augmentation des lymphocytes T CD8+CD107a+IFN- γ + présentant des caractéristiques de longévité avec des niveaux élevés en Bcl-2 et niveaux faibles en PD-1 qui ont éradiqué les cellules leucémiques. Mécaniquement, le Sorafénib réduit l'expression du facteur de transcription ATF4 ce qui va entraîner le blocage de la régulation négative de l'activation du facteur de régulation de l'IFN- γ renforçant la transcription de l'IL-15 et, in fine, conduire à une reprogrammation métabolique des lymphocytes T réactifs dirigés contre les cellules leucémiques en favorisant leur mémoire immunitaire. Par conséquent, le traitement au Sorafénib peut contribuer à une guérison à médiation immunitaire de la LMA (Mathew, 2018).

6. Modèles murins humanisés de GVHD

La plupart des connaissances sur l'immunobiologie de la GVHD aiguë ont été acquises à partir de modèles précliniques, en particulier des études menées sur la souris et le chien (Socié and Blazar, 2009). Effectivement, les modèles murins de GVHD ont contribué à améliorer le taux de réussite des HSCT chez l'homme en permettant une meilleure compréhension des réponses immunologiques impliquées dans la pathologie de la GVHD telles que la reconnaissance et la présentation des antigènes, l'implication du thymus et la reconstitution immunitaire après la transplantation. Les principaux événements qui interviennent dans le

développement de la GVHD aiguë chez la souris sont illustrés à la figure 20. Tout d'abord, l'étape du conditionnement qui, dans les modèles murins, est l'irradiation corporelle totale afin d'éliminer les cellules souches de la moelle osseuse de la souris dans le but de permettre la greffe de PBMCs (Schroeder and DiPersio, 2011) et d'empêcher son rejet ou simplement l'infusion de PBMCs chez des souris immunodéficientes humanisées (Mosier, 1988). Cette phase établit un environnement favorable, caractérisé par un milieu riche en IL-1 et en TNF- α favorisant ainsi l'amorçage de la réponse immunitaire impliquant l'activation et l'expansion des lymphocytes T du donneur. La prolifération des lymphocytes T du donneur et la libération de cytokines telles que l'IFN- γ stimulent l'activation d'autres cellules effectrices telles que les neutrophiles, les monocytes et les cellules NK ce qui peut, ensuite, conduire à une nouvelle expansion des lymphocytes T du donneur. L'étape finale menant aux lésions des organes dans le cadre de la GVHD aiguë est donc la toxicité tissulaire médiée par les lymphocytes T qui implique des médiateurs solubles telles que le TNF- α , la perforine, les granzymes, Fas et le ligand de Fas. En outre, les Th17 contribuent également à cette phase cytotoxique finale car ils sont capables de provoquer une inflammation et donc, in fine, une cytotoxicité accrue. Les Tregs ont, quant à eux, pour rôle de réprimer diverses réponses immunitaires, y compris les réponses des lymphocytes T qui sont réactifs aux allo-antigènes ou aux auto-antigènes (Schroeder and DiPersio, 2011).

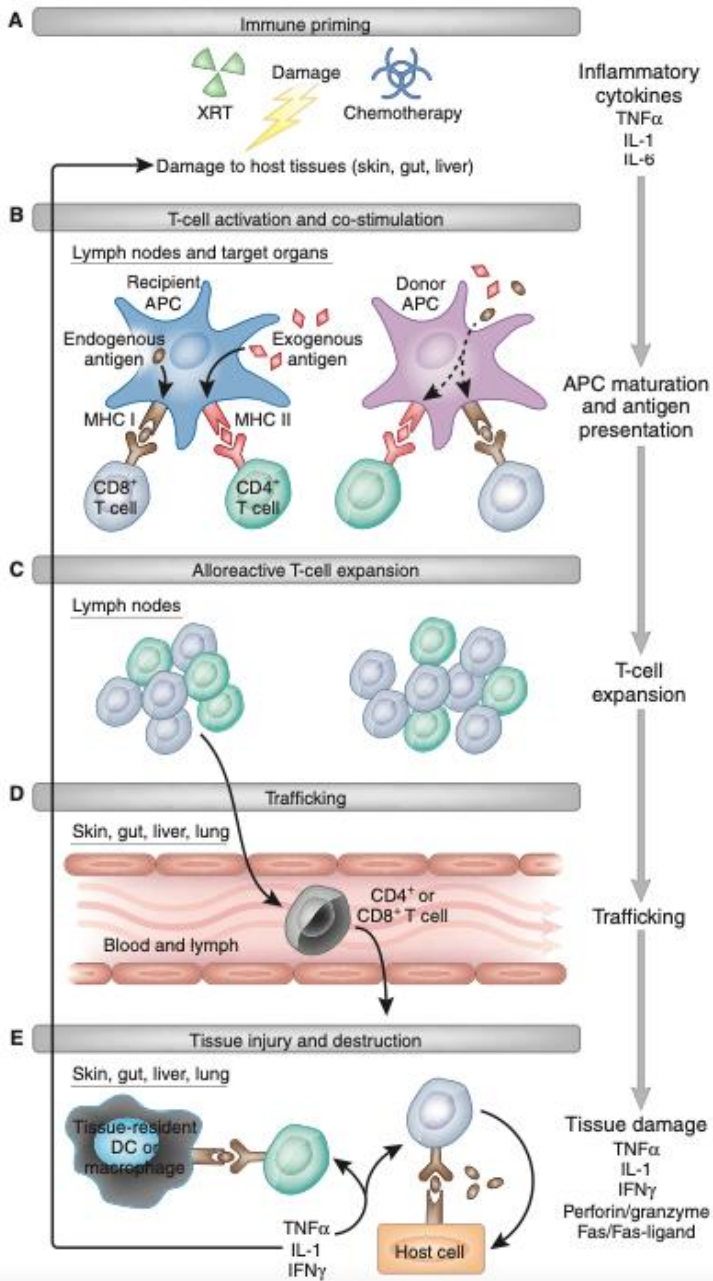


Figure 20. Les étapes du développement de la GVHD chez la souris. A) L'amorçage immunitaire, B) l'activation, C) l'expansion, D) la migration des lymphocytes T et, pour terminer, E) les dommages tissulaires de l'hôte. Figure venant de (Schroeder and DiPersio, 2011).

La sévérité de la GVHD aiguë chez la souris est influencée par plusieurs facteurs :

- La quantité et le type de sous-populations de lymphocytes T transférées avec le greffon du donneur incluant les CD4+, les CD8+ ou les Tregs.
- La dose d'irradiation qui est proportionnelle à l'étendue des lésions tissulaires et à la tempête cytokinique engendrée.
- Les disparités génétiques dans les miHA. Contrairement à l'homme, les souris consanguines partagent des similitudes dans les antigènes du CHM, appelé H2 mais peuvent présenter des différences dans leurs miHA.
- Les variations des agents pathogènes environnementaux entre les laboratoires et chez les souris provenant de différents fournisseurs (Schroeder and DiPersio, 2011).

Par conséquent, pour mener des études *in vivo* sur la GVHD, des souris immunodéficientes humanisées ont donc été développées. Effectivement, afin de pouvoir humaniser le système immunitaire, il est impératif que l'hôte receveur soit une souris immunodéficiente car celle-ci présente un environnement permissif à la xénotransplantation. La première souris développée dans ce sens est la souris Nude (*nu/nu*) qui est porteuse d'un gène muté codant pour la protéine Forkhead box N1 (FoxN1) responsable d'une agénésie thymique. Les souris Nude ne présentent pas de pilosité et sont dépourvues de lymphocytes T. Cependant, ce modèle présente des limitations importantes telles qu'une efficacité réduite de la prise de greffe et une faible reproductibilité, c'est pourquoi d'autres modèles d'études ont été développés tels que les souris

CB17-*scid* (Severe Combined ImmunoDeficiency), les souris SCID mutantes pour le gène *Prkdc* (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) qui affecte la réparation de l'ADN (Bosma, Custer and Bosma, 1983), les souris NOD/*Scid*, les souris NOG déficientes pour le gène codant pour la chaîne commune γ des récepteurs des IL suivantes IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, des souris *Rag1*^{-/-} déficientes pour l'enzymes RAG1 (Recombinaison activating gene) impliqués dans l'activation de la recombinaison V(D)J qui génère les récepteurs spécifiques d'Ag des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR) (Oettinger *et al.*, 1990), les souris BRG déficientes pour le gène RAG2 et IL2R γ , les souris NSG-IL15, les souris NSG-HLAA2, les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15 (Figure 21) (Shultz, Ishikawa and Greiner, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

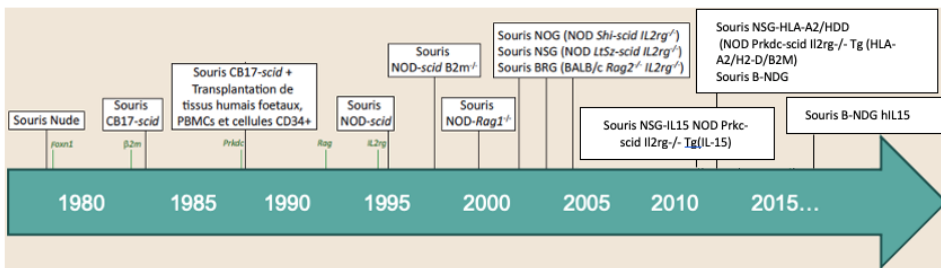


Figure 21. Développement de modèles murins immunodéficients. Figure adaptée de (Shultz, Ishikawa and Greiner, 2007).

Les souris immunodéficientes sont donc caractérisées par des mutations spécifiques ciblant des gènes clés du système immunitaire. En effet, des observations ont révélé qu'une souris portant la mutation *Scid* sur le fond génétique de la souris NOD (non obèse diabétique), connue pour son immunité affaiblie et sa susceptibilité accrue aux maladies auto-immunes, présentait une

reconstitution immunitaire humaine cinq fois plus importante que les souris Scid CB-17 originales. Cette combinaison NOD/Scid crée un environnement particulièrement favorable à la reconstitution immunitaire humaine en réduisant la compétition des cellules hôtes et en favorisant des interactions spécifiques entre les cellules humaines et le système immunitaire de la souris hôte (Shultz, Ishikawa and Greiner, 2007). Afin d'améliorer encore davantage ce modèle concernant la qualité et les niveaux de reconstitution immunitaire, la chaîne γ commune du récepteur à l'IL-2 (IL-2R γ c) a été désactivée entraînant ainsi l'absence de cellules NK. La mutation Scid avec l'IL-2R γ c KO a donné naissance à un modèle de souris sévèrement immunodéprimées de nouvelle génération à savoir les NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ), qui sont d'ailleurs de plus en plus utilisées (Ishikawa *et al.*, 2005; Ehx *et al.*, 2018), les NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac) (Ito *et al.*, 2002) et les BRG (BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R γ c^{-/-}) (Traggiai *et al.*, 2004). Les souris NOG et NSG se distinguent principalement par la nature de la suppression de la chaîne gamma commune du récepteur de l'IL-2. Dans les souris NSG, cette suppression est complète, tandis que dans les souris NOG, seule la queue cytoplasmique de la molécule est supprimée. Plusieurs souris ont donc été créées au fil des années (Tableau 4).

Tableau 4. Caractéristiques des souris immunodéficientes avec reconstitution de la lignée lymphoïde. Tableau adapté à partir de <https://biocytogen.com/products/immunodeficient-b-ndg-mice/b-ndg-mice/> et de (Schroeder and DiPersio, 2011; Puchalapalli *et al.*, 2016).

	NOD-Scid	BRG	NSG	NOG	B-NDG
Fonds génétique	Des souris SCID croisées avec des souris NOD	BALB/c	Souris NOD-SCID croisées avec des souris IL2γR-null → knock-out complet de ce récepteur de haute affinité pour les cytokines IL-2, -4, -7, -9, -15 et -21	Souris NOD-SCID croisées avec des souris IL2γR-null → troncation au niveau de la queue cytoplasmique → maintenance de sa capacité à se lier aux cytokines	NOD-Scid
Croisement	Consanguin	Consanguin	Consanguin	Consanguin	Consanguin
Pelage	Albinos	Albinos	Albinos	Albinos	Albinos
Lymphocyte T	/	/	/	/	/
Lymphocyte B	/	/	/	/	/
Cellule NK	Activité résiduelle	/	/	/	Dysfonctionnelle
Cellule dendritique	Faible	Dysfonctionnelle	Dysfonctionnelle	Dysfonctionnelle	Dysfonctionnelle
Macrophage	Dysfonctionnel	Normal	Dysfonctionnel	Tolérance	Dysfonctionnel
Complément	Faible	Normal	/	Faible	/
Immunité innée	Altérée	Altérée	Altérée	Altérée	Altérée
Tolérance à l'irradiation	Faible	Élevée (> 8Gy)	Faible (< 3Gy)	Faible	Faible
Émergence de lymphome	Haute	Indéfinie	Lymphome thymique	Faible	Indéfinie
Gènes d'intérêt	Prkdc ^{SCID}	Rag2 ^{-/-} IL-2Rγ ^{-/-}	Prkdc ^{SCID} IL-2Rγ ^{-/-}	Prkdc ^{SCID} IL-2Rγ ^{-/-}	Prkdc ^{SCID} IL-2Rγ ^{-/-}
Xénogreffe	Reconstitution plus faible → Prise de greffe de 1 à 20%	Reconstitution plus faible	Permissive	Permissive	Permissive

Dans un second temps, ces modèles de souris ont été humanisées. Pour ce faire, il existe deux sources majeures de cellules immunitaires humaines qui sont utilisées pour créer un système immunitaire chez ces souris immunodéficientes soit les PBMCs ou soit les cellules souches hématopoïétiques humaines CD34+. La méthode la plus simple est la greffe de leucocytes déjà différenciés, connue sous le nom de modèle Hu-PBL-scid. Cette approche, datant de 1988, est largement utilisée pour étudier les réponses immunitaires humaines. Les PBMCs, provenant de donateurs sains, sont injectées par voie intraveineuse (Figure 22). C'est d'ailleurs

cette injection de PBMCs qui conduit au développement de la GVHD. Ce modèle offre donc une approche plus similaire à la situation humaine et a déjà fourni d'importantes informations sur la pathogénèse de la GVHD (Tary-Lehmann, Saxon and Lehmann, 1995; De La Rochere *et al.*, 2018).

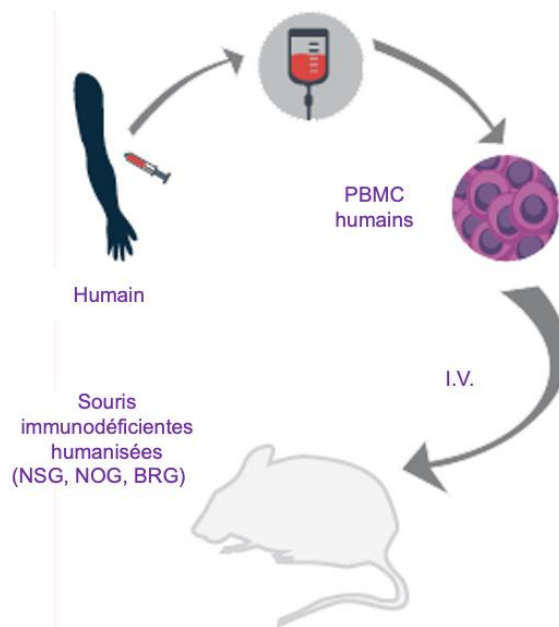


Figure 22. Humanisation d'une souris immunodéficiente. Modèle Hu-PBL-scid : Les PBMCs sont injectées par voie intraveineuse (i.v.) dans une souris adulte immunodéficiente. Figure adaptée de (De La Rochere *et al.*, 2018).

6.1 Les souris NSG

Les souris NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2R γ ^{tm1Wjl/SzJ}) sont le résultat de croisements entre trois souches de souris immunodéficientes à savoir les souris NOD, les souris SCID et les souris portant des mutations ciblées contre le gène codant pour la chaîne γ commune du récepteur de l'IL-2 (IL-2R γ c), partagée par les récepteurs de l'IL-

2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 et nécessaire pour le signal en aval de toutes ces cytokines (Jin *et al.*, 2021). Ces souris, développées en 2005, se distinguent par l'absence de lymphocytes T, de lymphocytes B, de cellules NK et de macrophages fonctionnels ce qui les rend idéales pour les études portant sur la HSCT ainsi que sur la GVHD (King *et al.*, 2008, 2009; Søndergaard, Kvist and Haase, 2012).

Leur immunodéficiência permet l'implantation constante de faibles doses de PBMCs humaines sans rejet immunitaire, même sans irradiation préalable, bien que cette dernière intensifie la gravité de la GVHD xénogénique. Lors de la xénotransplantation, les Tregs ont un rôle important concernant la régulation de la réponse immunitaire en inhibant l'activation des lymphocytes T effecteurs et en favorisant la tolérance immunitaire. Pour ce faire, les Tregs peuvent soit produire des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β qui vont supprimer l'activation des lymphocytes T effecteurs ou soit exprimer des molécules de surface telles que CTLA-4 et PD-1 qui vont interagir avec leurs ligands présents sur les CPA afin d'interférer avec les voies de signalisation nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Schmidt, Oberle and Krammer, 2012; Cai *et al.*, 2019).

Cependant, des limitations subsistent dans ce modèle de souris, notamment l'absence de CMH pour la sélection thymique, l'incapacité de produire des cytokines humaines essentielles pour le développement, la maturation et la survie des lymphocytes

humains, une réponse faible en termes de production d'anticorps ainsi que l'absence du complément.

Dans le cadre de la pathogenèse de la GVHD xénogénique chez les souris NSG, les réponses immunitaires engendrées par les lymphocytes T du donneur peuvent être déclenchées par la présentation de l'allo-antigène de deux manières. La première est la présentation de miHA présents chez les souris et présentés par le CMH aux lymphocytes T du donneur reconnaissent les miHA de la même manière qu'un antigène pathogène. Ce processus explique d'ailleurs pourquoi les donneurs non apparentés HLA compatibles présentent un risque plus élevé de développer une GVHD que les donneurs de la même fratrie HLA compatibles car la fréquence de la disparité génétique pour chaque miHA est généralement deux fois plus élevée. La seconde manière de reconnaître l'allo-antigène par les lymphocytes T du donneur se fait via le CMH non apparié s'il est structurellement suffisamment similaire à celui du CMH apparié. Ce processus explique pourquoi le nombre de loci du CMH non appariés (6/8, 7/8 vs 8/8 HLA) augmente de manière significative la GVHD et diminue la survie globale, quel que soit le type de maladie maligne sous-jacente. Les voies de présentation de l'antigène conduisant à la GVHD dans les systèmes de xénogreffes impliquent des souris immunodéficientes et leurs CPA qui stimulent une réponse des lymphocytes T humains (Koyama and Hill, 2021).

La GVHD xénogénique chez une souris NSG est donc déclenchée par les lymphocytes T humains qui reconnaissent via leur TCR les

antigènes présentés par le CMH murin, notamment H-2K, H-2D, H-2L pour le CMH de classe I, et I-A, I-E pour le CMH de classe II, exprimés par les cellules épithéliales thymiques de la souris receveuse. Cette reconnaissance de l'antigène est le premier signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Les molécules de co-stimulation jouent également un rôle clé dans l'activation complète des lymphocytes T. En effet, chez les souris NSG, les molécules murines B7 (CD80 et CD86) peuvent interagir avec le récepteur humain CD28 exprimé par les lymphocytes T humains, fournissant ainsi un second signal de co-stimulation afin de renforcer l'activation des lymphocytes T. Une fois activés par les signaux 1 et 2, les lymphocytes T humains produisent et libèrent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-2, l'IFN- γ et le TNF- α . Ces cytokines pro-inflammatoires contribuent à l'inflammation tissulaire et à la cytotoxicité des lymphocytes T, conduisant aux dommages tissulaires observés dans la GVHD xénogénique (Lee, Han and Lee, 2019). Dans le cadre de cette pathologie, les lymphocytes T (CD4+ et CD8+) subissent une différenciation rapide en lymphocytes effecteurs (CD45RA-CD27-) et en lymphocytes effecteurs mémoires (CD45RA-CD27+CD62L-) avec un profil Th1, produisant également des cytokines telles que TNF- α et IFN- γ . Les cellules Th1, en particulier, jouent un rôle important dans la production de TNF- α , une cytokine clé dans la GVHD (Freeman *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2021). De plus, les Th17 (IL-17A+IFN γ +) semblent également jouer un rôle prédominant dans la GVHD xénogénique car ils migrent vers les organes cibles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire et contribuant à la pathogenèse de cette maladie (Rajasha *et al.*,

2010). Concernant les cellules NK, celles-ci ne deviennent détectables qu'à partir de la quatrième semaine post-transplantation, bien qu'elles soient présentes en très faible nombre, à moins que les souris reçoivent une administration exogène de cytokines telles que le complexe IL-15-IL15R α . C'est pourquoi un modèle exprimant de manière constitutive de l'IL-15 a été développé pour pallier cette limitation (Gregoire-Gauthier *et al.*, 2015).

6.2 Les souris NSG-IL15

Les souris NOD.Cg-Prkd^{cscid}Il2rg^{tm1wjl} Tg(IL-15), NSG-IL15 sont une variante du modèle de souris immunodéficientes NSG dans laquelle le gène de l'IL-15 est surexprimé. Elles ont été développées dans le laboratoire de recherche du Dr. Leonard Shultz par injection pronucléaire d'un chromosome artificiel bactérien (Chori BACPAC RP11-620F3) d'environ 200 Kbp contenant le gène humain de l'IL-15 permettant ainsi la surexpression de l'IL-15 dans ces souris (Abeynaïke *et al.*, 2023). Les souris NSG-IL15 sont donc spécifiquement employées comme modèle d'étude des interactions entre l'IL-15 et le système immunitaire. En effet, les NSG-IL15 présentent des niveaux physiologiques d'IL-15 humaine (7,1 +/- 0,3 pg/ml) et donc une prise de greffe efficace sur le long terme des cellules immunitaires humaines, principalement des lymphocytes T et des cellules NK³. Elles pourraient donc être un bon modèle de GVHD.

³ <https://www.jax.org/strain/030890> consulté le 29/04/2024

A l'heure actuelle, une étude réalisée par E. Huarte et ses collaborateurs a été réalisée chez des souris NOG-IL15 pour étudier l'infiltration des lymphocytes T dans les organes cibles de la GVHD après infusion de PBMCs (Huarte, Peel, Juvekar, Dub, *et al.*, 2021). Cependant, les souris NOG-IL15 présentent des taux en IL-15 humaine 1000X plus élevés (1,0-4,0 ng/ml) que les souris NSG-IL15⁴.

Une autre étude réalisée par S. Abeynaïke et son équipe a quantifié les niveaux sériques de l'IL-15 humaine dans les sérums des souris NSG-IL15 transplantées avec des CSH issues de 4 sangs de cordon ombilical humain par ELISA. Une moyenne de 13,4 +/- 4,9 pg/mL d'IL-15 humaine a été rapportée. Ces niveaux sont modérément plus élevés que les niveaux moyens trouvés dans les sérums humains (Figure 23), bien que les niveaux d'IL-15 humains ne soient considérés comme pathologiquement élevés qu'au-dessus de 20 pg/mL (Abeynaïke *et al.*, 2023).

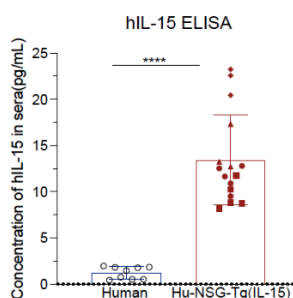


Figure 23. Quantification de la concentration d'IL-15 humaine dans les sérums des souris NSG-15 par ELISA réalisée par S. Abeynaïke et son équipe. Figure venant de (Abeynaïke *et al.*, 2023).

⁴ <https://www.taconic.com/products/mouse-rat/nog-portfolio/next-generation-nog-models/hil-15-nog> consulté le 29/04/2024

6.3 Les souris NSG-HLA-A2/HHD

Les souris NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}Tg (HLA-A2/H2-D/B2M) 1Dvs/Sz, NSG-HLA-A2/HHD, sont un modèle de souris qui combine les caractéristiques des souris NSG avec l'expression des molécules HLA-A0201 et de la microglobuline β 2 humaine en plus des molécules CMH murines de classe I et de classe II (Pascolo *et al.*, 1997; Shultz *et al.*, 2010). Le complexe majeur d'histocompatibilité HLA-A2 est une protéine de surface cellulaire humaine qui joue un rôle clé dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les souris NSG-HLA-A2/HHD sont donc principalement utilisées pour étudier les réponses immunitaires humaines et les interactions entre le système immunitaire et les cellules humaines HLA-A2 positives. Au sein de notre laboratoire, nous avons démontré que le modèle de souris NSG-HLA-A2/HDD est particulièrement intéressant pour l'étude de la GVHD xénogénique ainsi que les effets GvT. Ce modèle nous offre une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à ces phénomènes. De fait, nous avons observé que l'injection de PBMCs provenant de donneurs dépourvus de HLA-A2 entraînait une GVHD xénogénique plus sévère et des effets GvT plus importants. Cette constatation met en évidence le rôle déterminant de la disparité HLA dans l'amplification de la réponse immunitaire et de l'inflammation associée. Effectivement, la sévérité accrue est attribuée à la présence de récepteurs HLA-A2/HDD humains qui permettent une interaction plus spécifique entre les lymphocytes T humains greffés et les CPA de l'hôte ce qui permet une observation

plus détaillée de leurs interactions offrant ainsi un aperçu plus précis des mécanismes sous-jacents de la GVHD et des effets GvT. De plus, ces effets sont plus importants contre les lignées cellulaires positives pour HLA-A2 chez les souris NSG-HLA-A2/HHD que chez les souris NSG classiques, avec un répertoire de lymphocytes T CD8+ plus diversifié ce qui reflète mieux la complexité de la réponse immunitaire humaine. En conséquence, les souris NSG-HLA-A2/HDD constituent un modèle plus robuste et plus pertinent pour l'étude de l'effet GvT (Ehx *et al.*, 2018; Lee, Han and Lee, 2019).

6.4 Limitations des modèles murins humanisés

La pertinence de l'utilisation de ces modèles murins humanisés est bien démontrée par le fait que de nombreux médicaments actuellement utilisés en clinique pour prévenir ou traiter la GVHD chez l'homme se sont révélés être également efficaces, au préalable, pour prévenir la GVHD xénogénique chez les souris humanisées. Il s'agit notamment des inhibiteurs de la calcineurine, des inhibiteurs de la voie mTOR, du PTCy injecté en post-transplantation, de la protéine de fusion CTLA-4 IgG, des inhibiteurs JAK, de la Rapamycine ou encore de l'anticorps monoclonal anti-CD26 (Begelomab) (Søndergaard, Kvist and Haase, 2012; Hatano *et al.*, 2013; Ehx *et al.*, 2021; Huarte, Peel, Juvekar, Dub, *et al.*, 2021; Ritacco *et al.*, 2023). Néanmoins, l'utilisation de modèles humanisés murins comportent certaines limitations énumérées dans le tableau 5.

Tableau 5. Les forces et faiblesses de l'utilisation de modèles murins avec reconstitution de la lignée lymphoïde dans le cadre de l'étude de la GVHD.
 Tableau adapté de (Socié et al., 2021) et du site <https://www.oncodesign-services.com/fr/oncologie/modeles-humanises/>

Forces	Faiblesses
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Développement rapide de modèles humanisés ▪ Facilité d'accès aux PBMCs pour les xéno greffes ▪ Réalisation d'études efficaces et rapides ▪ Possibilité de réaliser un Knock-out ou un Knock-in (CRISPR-Cas9) ▪ Analyse détaillée des tissus ciblés par la GVHD ▪ Capacité de cibler des antigènes ▪ Idéal pour évaluer la prise de greffe, les cellules immunitaires et l'impact des médicaments sur celles-ci 	<ul style="list-style-type: none"> • Étude limitée par l'âge des souris (il est préférable de réaliser les expériences sur des souris jeunes, car l'âge influence le développement de la GVHD chez les souris) • Le conditionnement est basé sur l'irradiation ou absence de conditionnement • Pas de reconstitution autre que des lymphocytes T • Déclin du % des Tregs au cours du temps • Faible fenêtre thérapeutique • Croissance tumorale différente chez les modèles humanisés par rapport aux humains • Variation des résultats qui sont donneurs dépendants dans le cadre de xéno greffe

Objectifs

Objectifs

Les recherches menées au cours de ma thèse explorent divers aspects des réponses du système immunitaire après une HSCT, mettant l'accent sur la prévention de la GVHD et sans éradiquer l'effet GvT. Ces projets s'articulent autour de différentes approches novatrices.

Dans une perspective translationnelle, mes investigations se sont tournées vers l'utilisation de modèles murins humanisés offrant une plateforme unique pour examiner l'impact de certains médicaments ou de certaines cytokines sur la GVHD induite par des cellules immunitaires humaines. À cet égard, une évaluation de l'impact de l'Itacitinib, un inhibiteur spécifique de JAK1, sur la prévention de la GVHD et sur l'effet GvT a été entreprise. Dans une deuxième partie du travail, nous avons étudié si l'expression d'IL-15 par les souris NSG permettrait une plus forte infiltration des cellules immunitaires humaines dans le colon et la peau, deux organes cibles de la GVHD aiguë chez l'homme qui ne sont pas fortement atteints dans les modèles de GVHD xénogénique classiques. En résumé en explorant les liens entre l'immunité, l'Itacitinib, l'IL-15 et les modèles murins humanisés, ce travail aspire à ouvrir de nouvelles perspectives pour l'avenir des traitements post-greffe.

Partie 1 : Etude de l'Itacitinib

Ce projet vise à explorer les effets de l'Itacitinib, un inhibiteur sélectif de JAK1, sur la GVHD et sur l'effet GvT dans des modèles de souris humanisées (NSG et NSG-HLA-A2-HDD, respectivement). L'Itacitinib cible JAK1 qui joue un rôle clé dans la transduction du

signal de plusieurs cytokines telles que l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et l'IL-21 dont l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, cytokines directement impliquées dans la pathogénie de la GVHD. L'étude se concentre sur deux aspects principaux : évaluer l'impact de l'Itacitinib sur la GVHD xénogénique, ainsi que sur le phénotype des lymphocytes T transplantés et son effet sur la réaction GvT.

Partie 2 : Etude comparative de la prise de greffe et de la pathogénèse de la GVHD entre les souris NSG et les souris NSG-IL15

Dans le contexte de la GVHD, l'utilisation de la souris NSG-IL15 semble offrir un avantage significatif par rapport aux NSG classiques. En effet, l'utilisation d'une souche de souris conçue pour produire une cytokine humaine, l'IL-15, qui stimule les lymphocytes T CD8+, pourrait améliorer les modèles actuels de GVHD humanisés. Cela devrait entraîner une infiltration plus importante de lymphocytes T humains dans les organes cibles de la GVHD, tels que la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. En enrichissant le modèle avec une meilleure représentation de l'immunopathologie observée chez les patients, cette approche permettrait de reproduire de manière plus fidèle les aspects cliniques et pathologiques de la maladie renforçant ainsi la pertinence de ce modèle pour l'étude de la GVHD. Pour tester notre hypothèse, nous avons comparé la GVHD xénogénique induite par l'injection de PBMCs chez des souris NSG et des souris NSG-IL15. La reconstitution immunitaire a été analysée par cytométrie en flux à partir du sang des souris greffées aux jours 14, 21 et 28 post-HSCT, dans le but de mieux

comprendre l'impact de l'IL-15 sur ces populations cellulaires. Les souris ont également été évaluées pour la GVHD en examinant les indicateurs spécifiques tels que la posture, l'anémie, la perte de poids, la présence de diarrhée et la mobilité.

Résultats

Résultats – partie 1 : Etude de l'Itacitinib



Itacitinib prevents xenogeneic GVHD in humanized mice

Justine Courtois¹ · Caroline Ritacco¹ · Sophie Dubois¹ · Lorenzo Canti¹ · Benoît Vandenhove¹ · Laurence Seidel^{1,2} · Coline Daulne¹ · Jo Caers^{1,3} · Sophie Servais^{1,3} · Yves Beguin^{1,3} · Grégory Ehx¹ · Frédéric Baron^{1,3}

Received: 11 April 2021 / Revised: 6 May 2021 / Accepted: 18 May 2021 / Published online: 25 June 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2021

Abstract

We assessed the impact of the Janus Kinase (JAK) 1 inhibitor itacitinib on xenogeneic graft-versus-host disease (xGVHD). xGVHD was induced by i.v. injection 20×10^6 human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in NSG mice on day 0. Itacitinib (3 mg, =120 mg/kg) or methylcellulose was administered by force-feeding twice a day from day 3 to day 28. Mice were followed for xGVHD score and survival. In addition, human T-cell engraftment and as well as human T-cell subtypes were monitored in blood on days 14, 21, and 28 after transplantation. We observed that itacitinib-treated mice had significantly longer survival than control mice (median 45 versus 33 days; $P < 0.001$). Further, they also had lower absolute numbers of human CD4⁺ T cells on days 21 and 28 after transplantation as well as of human CD8⁺ T cells on days 14, 21, and 28 after transplantation. In addition, itacitinib-treated mice had higher frequencies of human regulatory T cells (Treg) on days 21 and 28 after transplantation. In summary, our data indicate that itacitinib decreases human T-cell engraftment, increases Treg frequencies and attenuates xGVHD in NSG mice transplanted with hPBMC.

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT) still remains the best therapeutic option for many patients suffering from acute myeloid leukemia [1]. Its efficacy is largely due to graft-versus-leukemia effects mediated by donor T cells present in the graft [2]. Unfortunately, these donor T cells can also target healthy tissues of the recipient, causing graft-versus-host disease (GVHD) which has remained an important cause of treatment failure in allo-HCT recipients.

Janus kinases (JAKs) are intracellular tyrosine kinase proteins that mediate signal transduction of several cytokine receptors present at the surface of immune cells such as T cells, B cells, macrophages as well as dendritic cells [3]. Three JAKs are involved in the signaling of cytokines associated with GVHD pathogenesis [4]. Briefly, JAK1 is involved in the signal transduction of IL-2, IL-6, IL-7, IL-21, INF α , and IFN γ , JAK2 in the signal transduction of IFN γ , IL-6, IL-12, IL-23, and GM-CSF as well as EPO and TPO, while JAK3 is involved in the signal transduction of IL-2, IL-4, IL-7, and IL-21 [3].

Confirming data observed in mouse-to-mouse models of GVHD as well as early clinical observations, the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib has recently been shown to induce higher response rates compared to other regimens in patients with steroid-refractory acute GVHD in a phase III trial [5]. However, a significant incidence of thrombocytopenia (and of anemia) was observed, probably due to JAK2 inhibition. These considerations support further studies assessing the efficacy of selective JAK1 inhibitors in GVHD.

Itacitinib is a specific JAK1 inhibitor currently assessed as treatment of acute and chronic GVHD in humans. Importantly, itacitinib has recently been shown to mitigate GVHD in a mouse-to-mouse model of GVHD [6]. Further, in that model, the drug reduced T-cell infiltration in GVHD target organs as well as serum levels of IL-1 β , TNF α , and

These authors contributed equally: Justine Courtois, Caroline Ritacco

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01363-1>.

✉ Frédéric Baron
f.baron@uliege.be

¹ Hematology Research Unit, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)-P, University of Liège, Liège, Belgium

² Department of Statistics, University of Liège, Liège, Belgium

³ Department of Medicine, Division of Hematology, CHU of Liège, Liège, Belgium

IFN γ [6]. While results of a phase I trial have been promising [7], itacitinib failed to improve the GVHD objective response rate at day 28 (primary endpoint of the GRAVITAS-301 study, 74% versus 66%, $P=0.08$) when added or not to steroids as first line treatment of acute GVHD [8]. However, post-hoc analysis showed higher day 28 complete remission (CR) rates when stratified for acute GVHD risk status (OR = 1.66, $P=0.008$) [8]. This stresses the need for further studies assessing the impact of itacitinib on human immune cells in experimental *in vivo* humanized GVHD models.

Here we assessed the impact of itacitinib on xenogeneic GVHD (xGVHD) induced by infusion of human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in NOD.Cg-Prkdc^{cid}Il2rg^{tm1Wj}/SzJ (NSG) mice [9]. Besides using human cells to induce and potentially control xGVHD, this model has the advantage of taking into consideration genetic diversity (since immune cells from different donors can be used). Indeed, prior studies have observed that the severity of xGVHD in that model was partly donor-dependent with some donors inducing more severe xGVHD than others [10, 11]. In addition, we also assessed the impact of itacitinib on graft-versus-leukemia effects in a newly developed humanized mouse model combining xeno and allo-reactivity [12, 13].

Methods

Induction and assessment of xGVHD in NSG mice

NSG (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), aged 7–16 weeks, were infused with 2×10^7 hPBMCs to induce xGVHD on day 0. hPBMC were isolated by Ficoll-Paque density centrifugation (GE Healthcare, Freiburg, Germany) of buffy coats obtained in healthy blood donors (Belgian Red Cross). GVHD severity was assessed by a scoring system that incorporates 4 clinical parameters: weight loss, posture (hunching), mobility, and anemia as previously reported [10]. Each parameter received a score of 0 (minimum) to 2 (maximum). Mice were assessed for GVHD score thrice weekly and monitored daily during the experiments. Mice reaching a GVHD score of 6/8 were sacrificed in agreement with the request of our ethical committee. Final scores for dead animals reaching the ethical limit score were “6” for the remaining time points. Final weights for dead animals reaching the ethical limit score were kept in the data set for the remaining time points (last value carried forward). No blinding was done regarding treatment received but GVHD scorings were performed by a technician (SD) who is a charge of mice welfare and not interested in the study outcome. All animal experiments used in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee of the

University of Liège, Belgium (protocol # 2115). The “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, was followed carefully.

Itacitinib administration

Itacitinib (kindly provided by Incyte Biosciences, Morges, Switzerland) was given orally by force-feeding at the dose of 3 mg (≈ 120 mg/kg) in 200 μ L of a methylcellulose solution twice a day from day 3 to day 28 after transplantation. Control mice were given 200 μ L of methylcellulose solution only.

Flow cytometry

Peripheral blood (PB) was drawn on days 14, 21, and 28 during survival experiments. PB was depleted of erythrocytes using RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer’s instructions. The following antibodies specific for human antigens were used: anti-mouse CD45-PECY5 (30-F11, Invitrogen), anti-human CD8-PECY7 (HIT8a, Biolegend), anti-human CD62L-APCCY7 (DREG56, Invitrogen), anti-human CD4-eFluor450 (RPA-T4, invitrogen), anti-human CD45-BV510 (HI30, BD), anti-human HLA-DR-BV605 (L243, Biolegend), anti-human CD27-BV650 (L128, BD), anti-human CD45RA-BV786 (HI100, Biolegend), anti-human CD25-BUV395 (2A3, BD), anti-human CD4-BV786 (SK3, BD), anti-human CD8-FITC (HIT8a, eBioscience), anti-human CD45RA-AF700 (HI100, BD), anti-human CD27-PE (BD), biotin anti-human CD194 (BD), streptavidin-APC (Biolegend), anti-human Granzyme B-FITC (BD), anti-human BCL2-PE (BD), anti-human Ki67-PerCP-Cy5.5 (B56, BD), anti-human FOXP3-PECF594 (259D/C7, BD), anti-human IL10-BV421 (JES3-9D7, Sony), anti-human IFN γ -PECY7 (4SB3, Invitrogen), anti-human TNF α -APCCY7 (MAb11, Sony), anti-human IL17-APC (eBio64DEC17, eBioscience), anti-human IL2-BV650 (5344.111, BD). Cells ($1.5\text{--}2 \times 10^6$ cells/sample), resuspended in 50 μ L of PBS + 3% FBS, were incubated with surface antibodies for 20 min at 4 $^{\circ}$ C in the dark and washed twice with PBS + 3% FBS. Intracellular staining for Granzyme B, BCL2, FOXP3, Ki67, and cytokines was performed by using the FOXP3 Staining Buffer Set (eBioscience). For intracellular IL-2 staining, samples were stimulated for 4 h in RPMI supplemented with 10% FBS, in presence of PMA/ionomycin, brefeldin A and monensin (Cell Stimulation Cocktail + Protein Transport Inhibitors, eBioscience). Total cell counts of human CD45⁺ cells in blood were calculated based on the absolute number of white blood cells (counted by using a Sysmex XS-800i cell counter) and on human cell chimerism (frequency of human

CD45⁺ cells among the total white blood cell population (%_{human}CD45⁺ + %_{mouse}CD45⁺). Data were acquired on a FACS FORTESSA flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with the Flowjo software 10.0 (Tree Star Inc., Ashland, OR). In gating strategies, regulatory T cells (Treg) were defined as CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ while remaining CD4⁺ T cells were termed conventional T cells (Tconv). Naïve T cells were defined as CD45RA⁺CD27⁺, effector T cells (TE) as CD45RA⁻CD27⁻, effector memory T cells (TEM) as CD45RA⁻CD27⁺CD62L⁻, and central memory T cells (TCM) as CD45RA⁻CD27⁺CD62L⁺.

Graft-versus-leukemia effects and bioluminescence imaging

For graft-versus-leukemia effect assessment, NSG-HLA-A2/HHD mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were co-injected with 3 millions luciferase-expressing THP-1 cells with or without 20 millions hPBM from a non-HLA-A0201 donor as previously reported [13]. Itacitinib was given as for the GVHD experiments. Bioluminescence analyses were made as previously reported [13]. In brief, mice were injected s.c. with 3 mg of D-luciferin (Promega, Madison, WI, USA) in PBS and imaged 12 min later. Tumor growth was evaluated by measuring the bioluminescence of THP-1 cells transfected to express the luciferase reporter gene by using the bioluminescent IVIS imaging system (Xenogen-Caliper, Hopkinton, MA). Mice were anesthetized using isoflurane (2.5% vaporized in O₂). For analysis, total photon flux (photons per second) was measured from a fixed region of interest over the entire abdomen using Living Image 4.5.2.

Serum cytokine levels

IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12 p70, IFN γ , and TNF α serum concentrations were quantified using Luminex Performance Human High Sensitivity Cytokine Magnetic Panel A assay (6-Plex, FCSTM09-06, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. Analysis of each sample was performed in duplicate. Data were collected and analyzed using a Luminex MAGPIX analyzer (APX1042, ThermoFisher Scientific). Data were collected and analyzed using a Luminex MAGPIX analyzer (APX1042, ThermoFisher Scientific).

Statistical analyses

The Mann-Whitney test was used to compare flow-cytometry data between 2 different groups. Comparisons between GVHD score curves were made using the 2-way ANOVA test. Survival curves were modeled using the Kaplan-Meier methods. Comparisons between groups were

made with the log-rank test. Prior studies have shown that in the NSG mouse model of GVHD cohorts of 8–10 animal per groups are optimal to detect a significant impact of the treatment [13]. Since they can be a donor variability in the NSG xGVHD model, we elected to perform three independent experiments with three different PBMC donors. Mice were allocated to treatment group before the start of the experiment (transplantation) but no randomization was performed. Thus, a multivariate Cox model was also performed to account for possible confounding factors (mouse weight, mouse age, mouse sex, PBMC donor). Parameters included in the Cox model included itacitinib or not, hPBMC donor (one donor by cohort), mouse weight, age, and sex. Data from all animals were taken into consideration in survival and GVHD score analyses. Data from all animals alive at that time point were taken into consideration for flow cytometry analyses. *P* values < 0.05 were considered as statistically significant and all *P* values were 2-sided. Statistical analyses were carried out with Graphpad Prism 8.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) and with SAS.

Results

Itacitinib mitigates xenogeneic GVHD

The impact of itacitinib on xGVHD was assessed in 3 independent experiments using hPBMC from 3 different donors. Combining data from the 3 experiments, itacitinib-treated mice had significantly longer survival than control mice (median 45 versus 33 days; *P* < 0.001) (Fig. 1). This was confirmed in a multivariate Cox model adjusted for PBMC donor, mouse weight, age and sex (HR = 0.33, 95% CI 0.18–0.61, *P* = 0.0004) (supplemental table 1). Similarly, GVHD scores and weight losses were lower in itacitinib-treated mice than in controls. Looking at the 3 cohorts separately, in the first experiment, itacitinib did not attenuate xGVHD as shown by comparable GVHD score, weight losses and survival in the 2 groups of mice (Supplementary Fig. 1). In contrast, in the second and third cohorts, itacitinib attenuated xGVHD as illustrated by lower xGVHD scores, slower weight losses and improved survival in itacitinib-treated mice (Supplementary Fig. 1).

Itacitinib decreases human T-cell engraftment

Absolute human CD45 counts were significantly lower in itacitinib-treated mice than in controls at days 14, 21, and 28 after transplantation (Supplemental Fig. 2). Accordingly, absolute numbers of human CD8⁺ T cells in the peripheral blood of transplanted NSG mice were significantly lower in itacitinib-treated than in control mice on days 14, 21, and 28 after transplantation (Fig. 1d). Similarly, itacitinib-treated

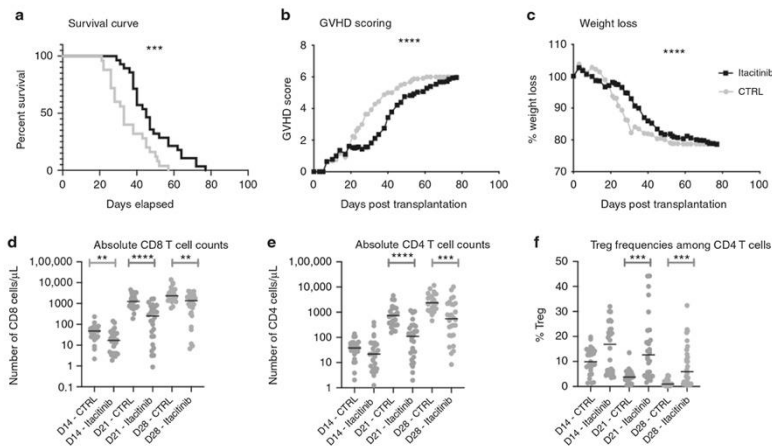


Fig. 1 Impact of itacitinib on xGVHD. Survival (a), GVHD scoring (b) and weight loss (c) in the three cohorts (with three different PBMC donors) combined. Gray line with circles shows control mice ($n = 25$) while black line with squares shows itacitinib mice ($n = 28$). Absolute CD8⁺ T-cell counts (d), absolute CD4⁺ T-cell counts (e) and Treg frequencies among CD4⁺ T-cells (f) in the three cohorts combined. NSG mice were injected with 2×10^7 human PBMCs. Mice were then treated twice daily with Itacitinib ($=120$ mg/kg) or a methylcellulose solution from day 3 to day 28 after transplantation. a–c Survival,

GVHD scoring and weight loss curves of three groups of mice transplanted with three different healthy donors ($n = 15$ for donor 1, $n = 18$ for donor 2 and $n = 20$ for donor 3, including 25 in the control and 28 in the Itacitinib group). d Comparison of absolute CD8⁺ T-cell counts for each mouse treated or not with Itacitinib. e Comparison of absolute CD4⁺ T-cell counts for mice treated or not with Itacitinib. f Comparison of Treg frequencies among CD4⁺ T-cells for mice treated or not with Itacitinib. Data show median values (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$).

mice had lower absolute numbers of CD4⁺ T cells on days 21 and 28 after transplantation (Fig. 1e). CD4/CD8 ratios were mostly not affected by itacitinib (data not shown). Over time, the proportion of naive T cells decreased in both groups in favor of an effector memory phenotype. This was observed both in CD4⁺ conventional T cells and in CD8⁺ T cells (Supplementary Fig. 3).

Itacitinib increases Treg frequencies

Given that prior studies demonstrated that Treg play an important role for xGVHD prevention in the NSG xGVHD model [10], we assessed the impact of itacitinib on Treg frequencies. We observed significantly higher Treg frequencies (among CD4⁺ T cells) in itacitinib-treated than in control mice on days 21 and 28 after transplantation (and a similar trend for day 14) (Fig. 1f and Supplementary Fig. 4). However, absolute Treg numbers were significantly lower in itacitinib-treated mice than in controls.

Given that Treg depend on IL-2 for their homeostasis [14], we assessed the production of IL-2 by CD4⁺ T cells from mice from the cohort 3 on day 28 after PBMC infusion

(Supplementary Fig. 5A). After in vitro stimulation by PMA/ionomycin we observed a higher proportion of CD4⁺ T cells from itacitinib-treated mice (median of 13.7%) than from control mice (median of 5.8%, $P = 0.0001$) producing IL-2 in intracellular staining. Accordingly, Treg from itacitinib-treated mice had higher expression of CD25 (MFI of 2283 versus 1777, $P = 0.0330$) and FoxP3 (MFI of 534 versus 396, $P = 0.0005$) than those from control mice, suggesting higher IL-2 signaling (Supplementary Fig. 5B–C). Further, assessment of serum cytokine levels on day 28 in 5 itacitinib-treated and 5 control mice showed a suggestion for lower INF γ (609 versus 1923 pg/mL, $P = 0.09$) and TNF α (37 versus 78 pg/mL, $P = 0.09$) in itacitinib-treated mice, IL-2 serum concentrations (3.2 versus 2.2 pg/mL, $P = 0.31$) were comparable despite of lower absolute T cell numbers in itacitinib-treated mice (Supplementary Fig. 5D–F).

Impact of itacitinib on peripheral blood T-cell subsets

We further assessed the impact of itacitinib on peripheral blood T-cell subsets on days 21 and 28 after transplantation

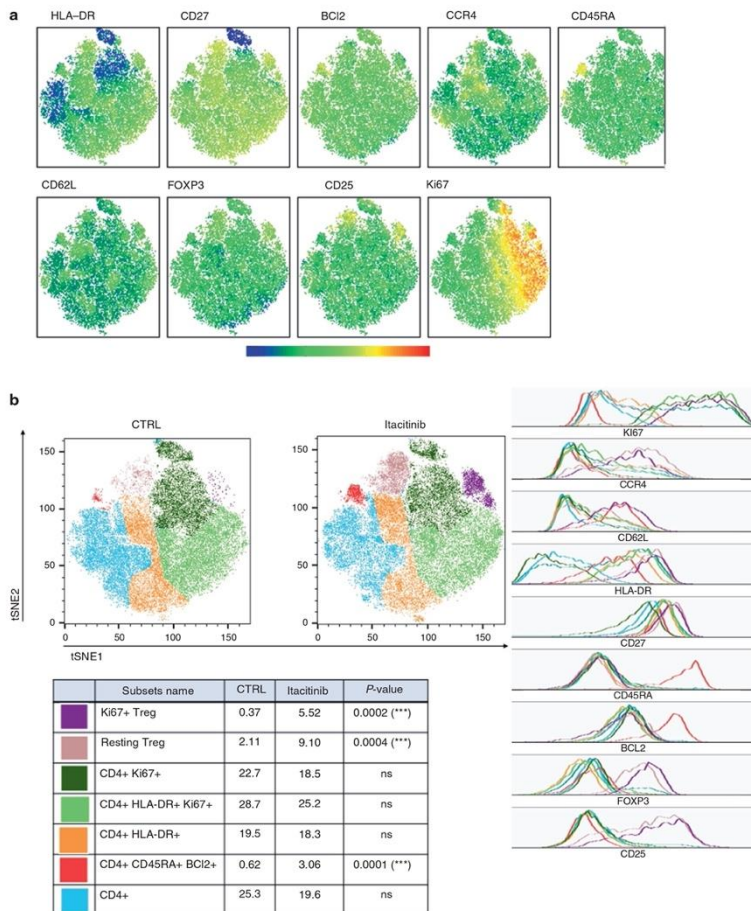
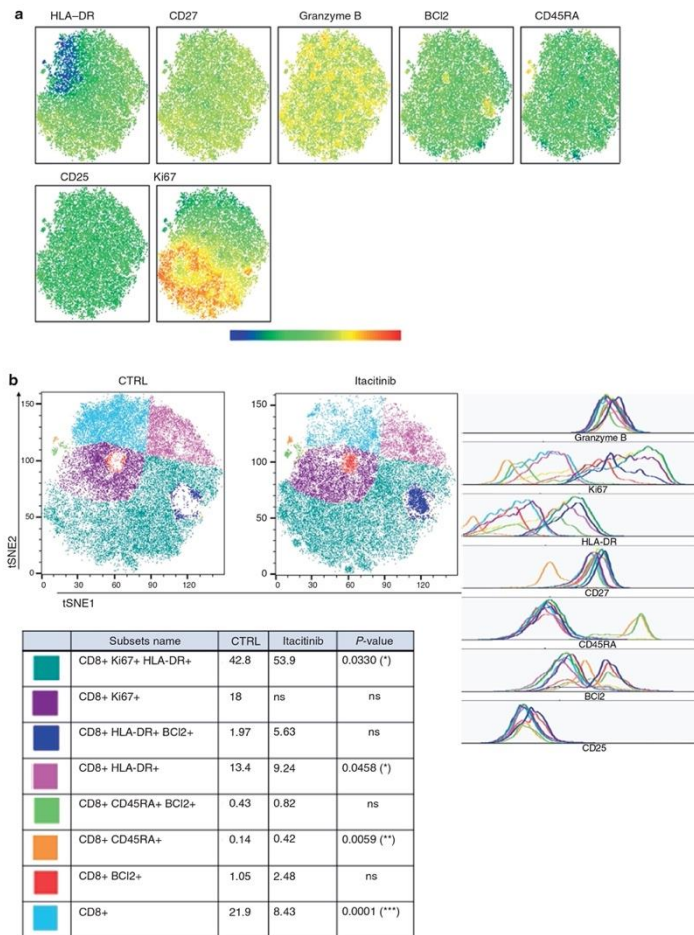


Fig. 2 T-SNE of CD4⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 3 on day 28 after transplantation. T-SNE were created on 20,135 CD4⁺ T cells and included HLA-DR, CD27, BCL2, CCR4, CD45RA, CD62L, FOXP3, CD25, and Ki67 markers. **a** Visualization of marker expression (MFI) among CD4⁺ T cells. **b** Seven populations were determined based on different marker expressions (geometric mean), i.e., Treg Ki67⁺ (purple), resting Treg (beige), CD4⁺ Ki67⁺

(dark green), CD4⁺HLA-DR⁺Ki67⁺ (light green), CD4⁺HLA-DR⁺ (orange), CD4⁺CD45RA⁺BCL2⁺ (red), and other CD4⁺ (blue) in the control and the itacitinib groups. Ki67⁺ Treg (purple, *P* = 0.0002), resting Treg (beige, *P* = 0.0004) and CD4⁺CD45RA⁺BCL2⁺ T cells (red, *P* = 0.0001) were increased in the treated group at day 28 in the cohort 3. Histograms show marker expression in subpopulations.



(in mice from cohort 3) using t-SNE analyses in human CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations. On day 21, we observed higher frequencies of CD4⁺CD45RA⁺BCL2⁺ cells ($P = 0.0001$), as well as Ki67⁺ Treg ($P = 0.0001$) and

Ki67⁻ Treg ($P = 0.002$), in itacitinib-treated mice (Supplementary Fig. 6). Regarding CD8⁺ T-cell subsets, the main changes included a higher proportion of naive CD8⁺ T cells (CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺; $P = 0.002$), a higher

Fig. 3 T-SNE of CD8⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 3 on day 28 after transplantation. T-SNE were created on 21,000 CD8⁺ T cells and included HLA-DR, CD27, Granzyme B, BCL2, CD45RA, CD25 and Ki67 markers. **a** Visualization of marker expression (MFI) among CD8 T cells. **b** Eight populations were determined based on different marker expressions (geometric mean), i.e. CD8⁺Ki67⁺HLA-DR⁺ (dark green), CD8⁺Ki67⁺ (purple), CD8⁺HLA-DR⁺BCL2⁺ (dark blue), CD8⁺HLA-DR⁺ (pink), CD8⁺CD45RA⁺BCL2⁺ (light green), CD8⁺CD45RA⁺ (orange), CD8⁺BCL2⁺ (red), and other CD8⁺ (light blue) in the control and the treated groups at day 28 in cohort 3. CD8⁺Ki67⁺HLA-DR⁺ (dark green, $P = 0.033$) and CD8⁺CD45RA⁺ (orange, $P = 0.0059$) were increased in the treated group at day 28 in the cohort 3. CD8⁺HLA-DR⁺ (pink, $P = 0.0458$) and other CD8⁺ T cells (light blue, $P = 0.0001$) were decreased in the treated group at day 28 in cohort 3. Histograms show marker expression of subpopulations.

proportion of CD8⁺CD45RA⁺Ki67⁺GranzB⁺ cells ($P = 0.002$) and of CD8⁺Ki67⁺CD27⁺GranzB⁺ cells ($P = 0.0001$) (Supplementary Fig. 7).

On day 28, regarding CD4⁺ T-cell subsets, we observed higher frequencies of CD4⁺CD45RA⁺BCL2⁺ cells ($P = 0.0001$), as well as Ki67⁺ Treg ($P = 0.0002$) and Ki67⁺ Treg ($P = 0.0004$) in itacitinib-treated mice (Fig. 2). Higher frequencies of Ki67⁺ Treg ($P = 0.0002$) and Ki67⁺ Treg ($P = 0.008$) were also observed in mice from the second cohort of itacitinib-treated mice (Supplementary Fig. 8). Regarding CD8⁺ T-cell subsets, the main changes included a higher proportion of CD8⁺Ki67⁺HLA-DR⁺ cells ($P = 0.03$) (Fig. 3). This was also observed in mice from the second cohort (Supplementary Fig. 9).

Impact of itacitinib on graft-versus-leukemia effects

We finally assessed the impact of itacitinib on graft-versus-leukemia effects. We observed that itacitinib failed to improve survival in comparison to control mice. On day 31 after PBMC infusion, mice given hPBMC + THP-1 cells had significantly lower tumor burden than mice not given hPBMC (and given or not itacitinib) (Fig. 4). This was not observed in mice given hPBMC + THP-1 cells + itacitinib suggesting that the drug might somewhat decrease graft-versus-leukemia effects.

Discussion

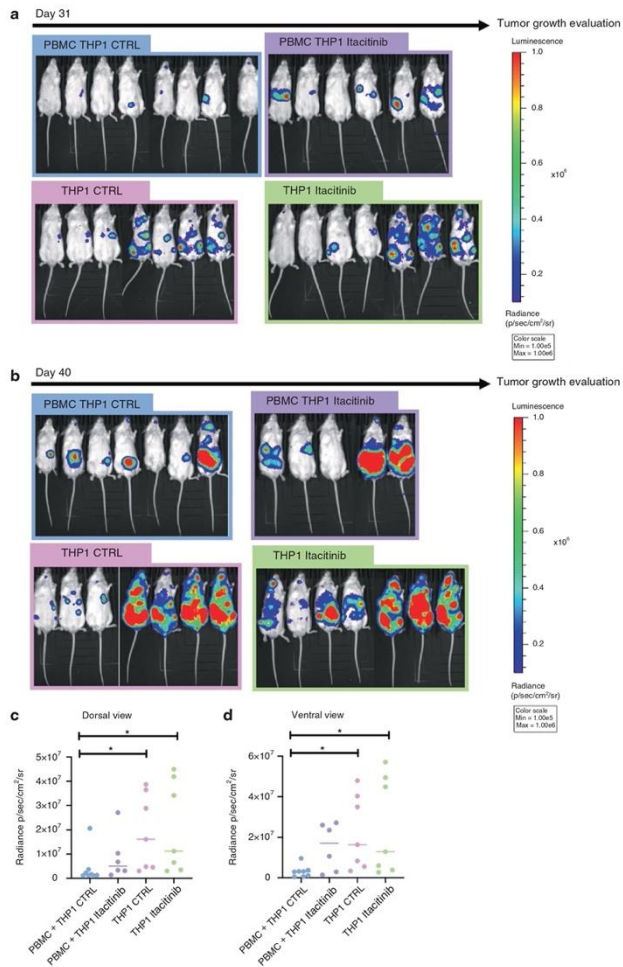
The pathogenesis of xGVHD induced by hPBMC infusion in NSG mice has been partly elucidated. Studies have demonstrated that the disease is caused by a fraction of human T cells [12], reacting against mouse MHC [9, 15–17]. The second signal (also required for xGVHD) is provided by interaction between mouse B7.1 and B7.2 and CD28 expressed on human T cells [18]. The third signal for

CD8⁺ T-cell activation is provided by cytokines secreted by activated human CD4⁺ T cells [15] (i.e. mainly IL-2, INF γ , and TNF α but also IL-17 [19–22]). While it has been recently established that JAK-1/2 inhibitors are effective as treatment for steroid-refractory GVHD [23], it remains to be established whether similar results can be achieved with specific JAK1 inhibitors (which will likely induce less cytopenia since they do not target EPO and TPO signaling transduction). Here, we used the NSG humanized mouse model to assess the impact of itacitinib on xGVHD. We believed that this is highly relevant given the important differences between mouse and human T cell biology (particularly for Treg). Several observations were made.

The first and most important observation was that itacitinib attenuated xGVHD. This observation is in line with recent observations made in a mouse-to-mouse model of GVHD [6]. The ability of JAK1 inhibitor to attenuate xGVHD should be seen in line with prior observations showing that a selective JAK-2 inhibitor failed to prevent xGVHD when given alone (although it increases the anti-xGVHD potential of an aurora kinase A inhibitor) in the NSG mouse model [24]. However, our data indicate that the benefit of itacitinib might be donor-dependent, since it was not observed with 1 of the 3 donors that provided hPBMC for xGVHD induction. Prior observations have demonstrated that the severity of xGVHD in the NSG model is donor-dependent, possibly because the immune reaction is launched by human T cells recognizing mouse MHC by antigen mimicking (which might differ from one donor to another) [12].

A second observation of our study was that itacitinib decreased the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells after hPBMC infusion. This is in concordance to what has been recently observed in a mouse-to-mouse model of GVHD [6].

A third observation of the study was that itacitinib increased Treg frequency. This is in line with what has been observed with the JAK-1-2 inhibitor ruxolitinib in mouse-to-mouse models of GVHD [23]. This observation might be of importance given prior studies showing the important role of Treg for xGVHD prevention in the NSG mouse model [10, 25, 26]. However, it should be noted that absolute Treg numbers were actually lower in itacitinib-treated than in control mice, stressing that itacitinib did not per se promote Treg but rather impacted Tconv more than Treg. Since Treg depend on IL-2 for their homeostasis [14, 27] as well as for their ability to prevent GVHD in mouse-to-mouse models of GVHD [28, 29], we compared IL-2 production by CD4⁺ T cells from itacitinib-treated versus control mice after in vitro stimulation by PMA/ionomycin. Indeed, human T cells are the only source of IL-2 in this humanized mouse model of GVHD and low-dose IL-2 administration in NSG mice infused by human PBMC results in higher Treg proportion [12, 22, 19]. We



observed a higher production of IL-2 by CD4⁺ T cells from itacitinib-treated than from control mice. Further, we observed higher CD25 and FoxP3 expression by Treg from

itacitinib than from control mice suggesting that IL-2 signal transduction by JAK3 is predominant for Treg homeostasis in the humanized mouse model.

Fig. 4 Impact of itacitinib on GvL effects. NSG-A2 mice were infused intravenously with 2×10^7 human PBMCs and 3×10^6 THP-1-luc cells. Mice were then treated twice daily with Itacitinib (≈ 120 mg/kg) or a methylcellulose solution from day 3 to day 28 after transplantation. **a** Bioluminescence was monitored. Images acquired at day 31 are shown with the Y axis indicating radiance (photon/sec/cm²/sr) measured from the dorsal view and the ventral view with a region of interest drawn over the entire body of each mouse and compared in subfigures (c, d). **b** Images acquired at day 40. **c** Comparison of bioluminescence at day 31 in dorsal view. **d** Comparison of bioluminescence at day 31 in ventral view. Data show median values (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$).

Finally our data suggest that itacitinib might decrease graft-versus-leukemia effects. This was observed in a humanized mouse model of GvL effects in which one strong antigen (the HLA-A0201) is shared between the GVHD and GvL effects despite the GvL reaction is allogeneic and not xenogeneic [12]. This observation might not be surprising since several clinical studies have observed a strong link between occurrence of GVHD and graft-versus-leukemia effects [30–35]. This observation is however in contrast to what has been observed with other molecules such as azacytidine (which was able to reduce GVHD without affecting graft-versus-leukemia effects in this model [13]), possibly because of the direct impact of azacytidine on THP-1 cells.

In summary, our data show that itacitinib mitigated xGVHD induced by infusion of hPBMC, possibly through decreasing absolute human T-cell numbers and perhaps increasing Treg frequencies.

Data availability

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files. Raw files used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements We are grateful to Sandra Ormenese, Raafat Stephan, and Céline Vanwinge from the Imaging and Flow Cytometry Platform of the GIGA for help with flow cytometry analyses. We are also grateful to INCYTE Biosciences who kindly gave us itacitinib.

Author contributions FB designed the study; JC, CR, and SD performed the experiments; LC, BV, and CD helped in the experiments; JC, LS and CR analyzed the data; JC, CR, GE, and FB interpreted the data; SS, JCA and YB helped in data interpretation; FB and JC wrote the article; all authors reviewed and edited the manuscript.

Funding This study was supported by funds from: the National Fund for Scientific Research (FNRS) (grant numbers T.0069.15 and T.0016.20), The Belgian Fondation contre le cancer (grant # FBC # FAF-C/2016/889), and the Leon Fredericq fund and Anti-Cancer Center at the University of Liège. GE is a Télévie Research Assistant, and FB is a senior research associate of the National Fund for Scientific Research (FNRS) Belgium.

SPRINGER NATURE

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Frédéric Baron has received travel grants from Celgene, Abbvie, Novartis, INCYTE Biosciences, and Sanofi as well as honoraria from Merck and Abbvie. The remaining authors declare that they have no relevant conflict of interest in regard to this study.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Baron F, Efficace F, Cannella L, Muus P, Trisolini S, Halkes CJM, et al. Impact of the type of anthracycline and of stem cell transplantation in younger patients with acute myeloid leukemia: Long-term follow up of a phase III study. *Am J Hematol*. 2020;95:749–58.
- 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;23:1993–2003.
- Hammarén HM, Virtanen AT, Raiola J, Silvennoinen O. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease. *Cytokine*. 2019;118:48–63.
- Schroeder MA, Choi J, Staser K, DiPersio JF. The role of janus kinase signaling in graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2018;24:1125–34.
- Zeiser R, von Bubnoff N, Butler J, Mohty M, Niederwieser D, Or R, et al. Ruxolitinib for glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2020;382:1800–10.
- Covington M, He X, Scuron M, Li J, Collins R, Juvekar A, et al. Preclinical characterization of itacitinib (INCB039110), a novel selective inhibitor of JAK1, for the treatment of inflammatory diseases. *Eur J Pharm*. 2020;885:173505.
- Schroeder MA, Khoury HJ, Jagasia M, Ali H, Schiller GJ, Staser K, et al. A phase 1 trial of itacitinib, a selective JAK1 inhibitor, in patients with acute graft-versus-host disease. *Blood Adv*. 2020;4:1656–69.
- Zeiser R, Socié G, Schroeder MA, Abhyankar S, Pinho Vaz C, Kwon M et al. GRAVITAS-301: A Randomized, double-blind phase 3 study of itacitinib or placebo in combination with corticosteroids for initial treatment of patients with acute graft-versus-host disease. *EHA Library* 2020; S256.
- King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. 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*. 2009;157:104–18.
- Hannon M, Lechanteur C, Lucas S, Somja J, Seidel L, Belle L, et al. Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2014;54:353–63.
- Gregoire C, Ritacco C, Hannon M, Seidel L, Delens L, Belle L, et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from different origins for the treatment of graft-vs.-host-disease in a humanized mouse model. *Front Immunol*. 2019;10:619.
- Ehx G, Somja J, Warnatz H-J, Ritacco C, Hannon M, Delens L, et al. Xenogeneic graft-versus-host disease in humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHd mice. *Front Immunol*. 2018;9:1943.
- Ehx G, Fransolet G, de Leval L, D'Hondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacytidine prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1314425.

14. Pierson W, Cauwe B, Policheni A, Schlenner SM, Franckaert D, Berges J, et al. Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2013;14:959–65.
15. Kawasaki Y, Sato K, Hayakawa H, Takayama N, Nakano H, Ito R, et al. Comprehensive analysis of the activation and proliferation kinetics and effector functions of human lymphocytes, and antigen presentation capacity of antigen-presenting cells in xenogeneic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2018;24:1563–74.
16. Brehm MA, Kenney LL, Wiles MV, Low BE, Tisch RM, Burzenski L, et al. Lack of acute xenogeneic graft-versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression. *FASEB J*. 2019;33:3137–51.
17. Coman T, Rossignol J, D'Aveni M, Fabiani B, Dussiot M, Rignault R, et al. Human CD4-invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology*. 2018;7:e1470735.
18. Søndergaard H, Kvist PH, Haase C. Human T cells depend on functional calcineurin, tumour necrosis factor- α and CD80/CD86 for expansion and activation in mice. *Clin Exp Immunol*. 2013;172:300–10.
19. Pérol L, Martin GH, Maury S, Cohen JL, Piaggio E. Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunol Lett*. 2014;162:173–84.
20. Abraham S, Guo H, Choi J-G, Ye C, Thomas MB, Ortega N, et al. Combination of IL-10 and IL-2 induces oligoclonal human CD4 T cell expansion during xenogeneic and allogeneic GVHD in humanized mice. *Heliyon*. 2017;3:e00276.
21. Delens L, Ehx G, Somja J, Vrancken L, Belle L, Seidel L, et al. In Vitro Th17-Polarized Human CD4(+) T Cells Exacerbate Xenogeneic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2019;25:204–15.
22. Ehx G, Ritacco C, Hannon M, Dubois S, Delens L, Willems E, et al. Comprehensive analysis of the immunomodulatory effects of rapamycin on human T cells in graft-versus-host disease prophylaxis. *Am J Transplant*. 2021. <https://doi.org/10.1111/ajt.16505>.
23. Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, Schmitt-Graeff A, Chen S, Mueller T, et al. Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123:3832–42.
24. Betts BC, Veerapathran A, Pidalá J, Yang H, Homa P, Walton K, et al. Targeting Aurora kinase A and JAK2 prevents GVHD while maintaining Treg and antitumor CTL function. *Sci Transl Med* 2017; 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8269>.
25. Wang H, Song H, Pham AV, Cooper LJ, Schulze JJ, Olek S, et al. Human LAP(+)GARP(+)FOXP3(+) regulatory T cells attenuate xenogeneic graft versus host disease. *Theranostics*. 2019;9:2315–24.
26. Cuende J, Liénart S, Dedobbeleer O, van der Woning B, De Boeck G, Stockis J, et al. Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med*. 2015;7:284ra56.
27. Liston A, Gray DHD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:154–65.
28. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006;108:390–9.
29. Zeiser R, Negrin RS. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle*. 2008;7:458–62.
30. 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;26:2462–8.
31. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75:555–62.
32. Ringdén O, Pavletic SZ, Anasetti C, Barrett AJ, Wang T, Wang D, et al. The graft-versus-leukemia effect using matched unrelated donors is not superior to HLA-identical siblings for hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113:3110–8.
33. Baron F, Labopin M, Savani BN, Beohou E, Niederwieser D, Eder M, et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia effects in secondary acute myeloid leukaemia: a retrospective, multicentre registry analysis from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Br J Haematol*. 2020;188:428–37.
34. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, et al. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transpl*. 2011;11:1148–57.
35. Boucault L, Lopez Robles M-D, Thiolat A, Bézie S, Schmueck-Henneresse M, Braudeau C, et al. Transient antibody targeting of CD45RC inhibits the development of graft-versus-host disease. *Blood Adv*. 2020;4:2501–15.

Supplemental table 1.

Multivariate Cox models assessing the impact of itacitinib on xGVHD.

1. Model including all NSG mice.

N=53

Parameter	Univariate			Multivariate				
	HR	95% CI	HR	95% CI	HR	P-value		
Itacitinib Yes vs No	0.393	0.219	0.705	0.0017	0.328	0.176	0.610	0.0004
Donor 2 vs. 1	1.113	0.555	2.229	0.12	1.097	0.487	2.473	0.18
Donor 3 vs. 1	1.960	0.967	3.971		3.456	0.904	13.204	
Donor 2 vs. 3	0.568	0.293	1.101		0.317	0.062	1.636	
Male vs. Female mouse	1.719	0.914	3.233	0.093	1.913	0.435	8.405	0.39
Mouse age	0.991	0.976	1.007	0.26	1.018	0.978	1.060	0.38
Mouse weight	1.077	0.995	1.166	0.067	0.976	0.801	1.190	0.81

HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

2. Model including only NSG mice given itacitinib.

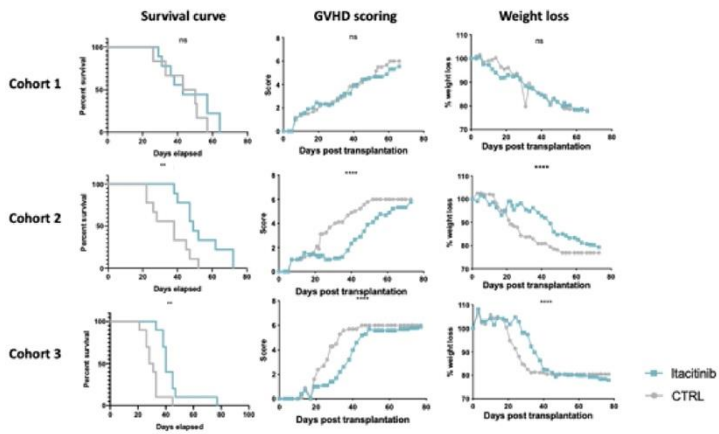
N=28

Parameter	Univariate			Multivariate				
	HR	95% CI	HR	95% CI	HR	P-value		
Donor 2 vs. 1	0.710	0.276	1.827	0.54	0.376	0.105	1.353	0.23
Donor 3 vs. 1	1.202	0.460	3.140		3.636	0.445	29.724	
Donor 2 vs. 3	0.590	0.230	1.516		0.103	0.007	1.623	
Male vs. Female mouse	1.530	0.629	3.723	0.35	2.345	0.282	19.478	0.43
Mouse age	0.997	0.976	1.018	0.75	1.049	0.982	1.120	0.15
Mouse weight	1.072	0.959	1.197	0.22	0.945	0.721	1.239	0.68

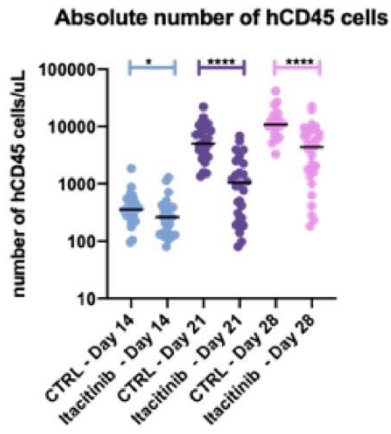
HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

Supplemental figure 1. Impact of itacitinib on xGVHD. Survival, GVHD score and weight loss in the three different cohorts (with 3 different PBMC donors). Grey line with circles shows control mice (n = 6 in cohort 1, n = 9 in cohort 2, n = 10 in cohort 3) while green line with squares shows itacitinib mice (n = 9 in cohort 1, n = 9 in cohort 2, n = 10 in cohort 3).

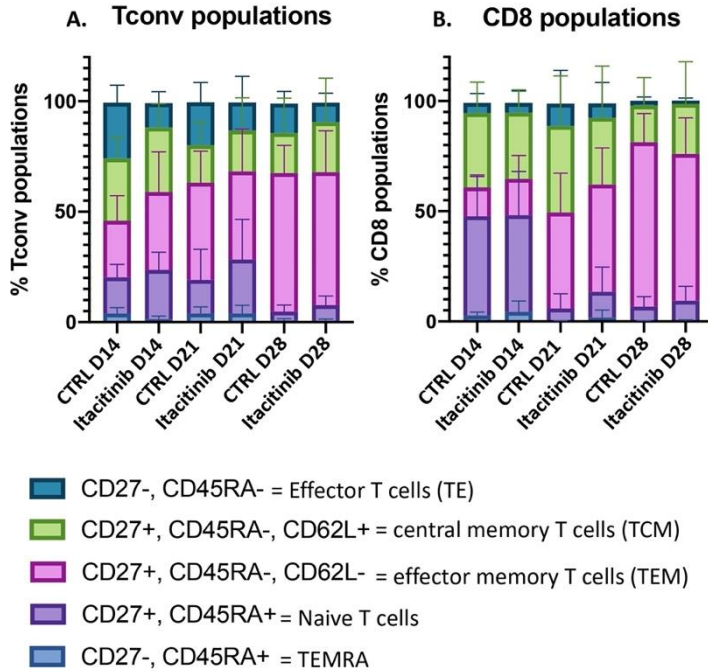
NSG mice were injected with 2×10^7 human PBMCs. Mice were then treated twice per day with Itacitinib (≈ 120 mg/kg) or a methylcellulose solution from day 3 to day 28 after transplantation. Survival (ns), GVHD scoring (ns) and weight loss (ns) curves of cohort 1 (n = 15 for donor 1) were no different. Survival (**), GVHD scoring (****) and weight loss (****) curves of cohort 2 (n = 18 for donor 2) were significantly different. Survival (**), GVHD scoring (****) and weight loss (****) curves of cohort 3 (n = 20 for donor 3) were significantly different.



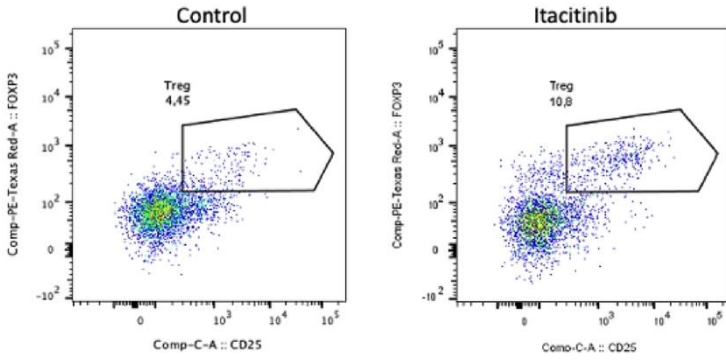
Supplemental figure 2. Absolute hCD45 counts. There was a lower number of hCD45/uL in the treated group at different timepoints (day 14, day 21 and day 28).



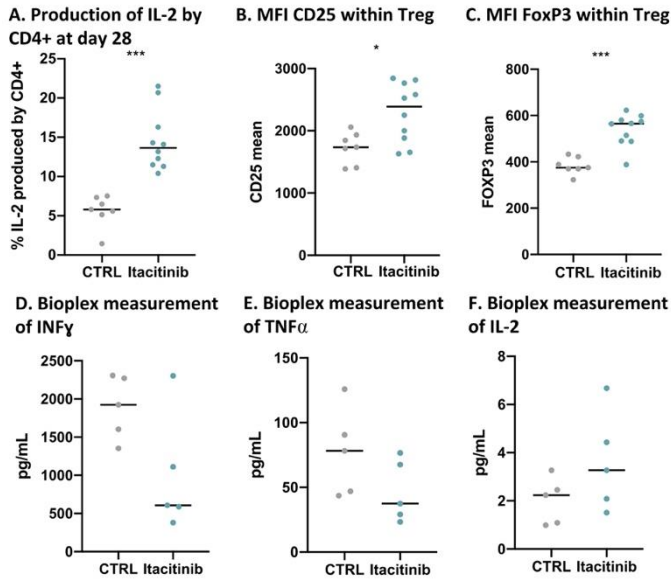
Supplemental figure 3. Tconv and CD8⁺ T cell subpopulations. (A) Visualization of different subpopulations of Tconv. Effector T cells (TE) (turquoise), central memory T cells (TCM) (green), effector memory T cells (TEM) (pink), naive T cells (purple), TEMRA (blue) at different timepoints (day 14, day 21 and day 28). (B) Visualization of different subpopulations of CD8⁺ T cells. Effector T cells (TE) (turquoise), central memory T cells (TCM) (green), effector memory T cells (TEM) (pink), naive T cells (purple), TEMRA (blue) at different timepoints (day 14, day 21 and day 28).



Supplemental figure 4. Dot-plots with Treg population. Representative example of dot-plots showing Treg cells in itacitinib or control mice.

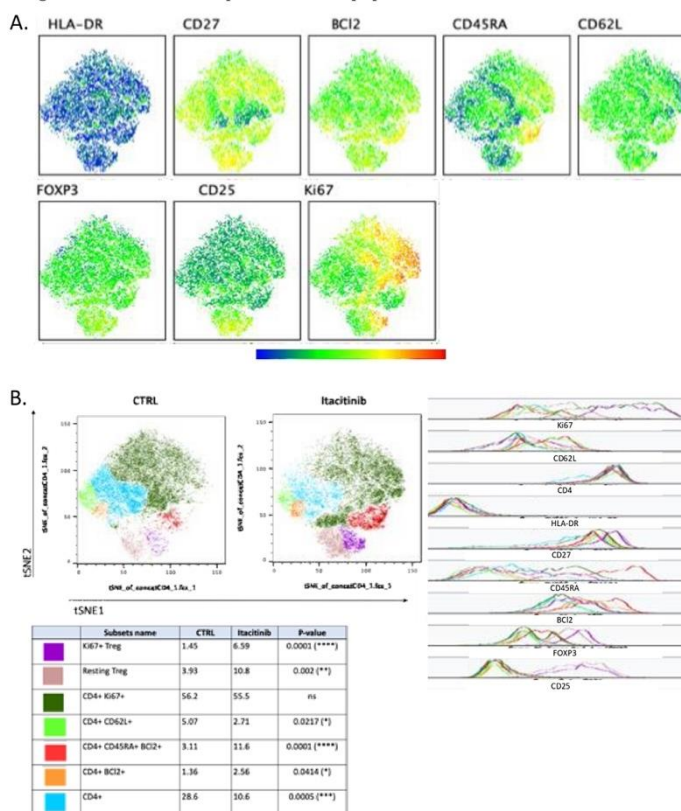


Supplemental figure 5. Impact of itacitinib on IL-2 in vivo. (A). Production of IL-2 by Tconv at day 28. Intracellular IL-2 staining after in vitro stimulation by PMA/ionomycin of CD4⁺ conventional T cells recovered from mice from the cohort 3 on day 28 after PBMC infusion and given or not itacitinib. **(B-C). Mean Fluorescence Intensity (MFI) CD25 (B) and FoxP3 (C) within Treg** from mice from the cohort 3 on day 28 after PBMC infusion and given or not itacitinib. **(D-F). Bioplex measurement of serum cytokine levels at day 28 in 5 itacitinib-treated and 5 control mice; (D) INF γ (P=0.09); (E) TNF α (P=0.09); and (F) IL-2 (P=0.31).**



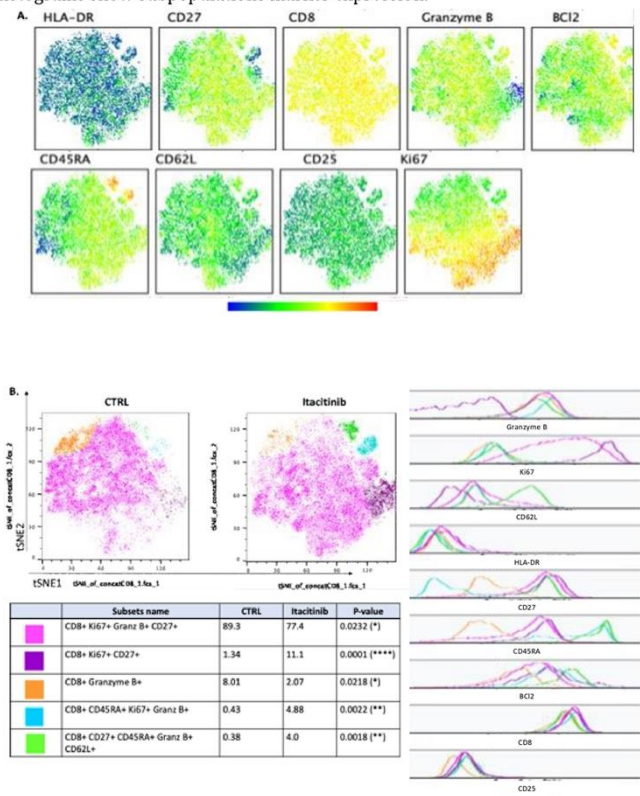
Supplemental figure 6. t-SNE of CD4⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 3 on day 21 after transplantation.

T-SNE were created on 11,040 CD4⁺ T cells and included HLA-DR, CD27, BCl2, CD45RA, CD62L, FOXP3, CD25 and Ki67 markers. **(A)** Visualization of marker expression (MFI) among CD4⁺ T cells. **(B)** Seven populations were determined based on different marker expressions (geometric mean), i.e. Ki67⁺ Treg (purple), resting Treg (beige), CD4⁺Ki67⁺ (dark green), CD4⁺CD62L⁺ (light green), CD4⁺CD45RA⁺BCl2⁺ (red), CD4⁺BCl2⁺ (orange), and other CD4⁺ T cells (blue) in the control and the itacitinib groups. Ki67⁺Treg (purple, P=0.0001), resting Treg (beige, P=0.002), CD4⁺CD45RA⁺BCl2⁺ (red, P=0.0001), and CD4⁺BCl2⁺ (orange, P=0.0414) T cells were significantly higher in the treated group at day 21 in cohort 3. In contrast, CD4⁺CD62L⁺ (P=0.0217), and other CD4⁺ T cells (P=0.0005) were significantly lower in the treated group at day 21 in cohort 3. Histograms show marker expression of subpopulations.



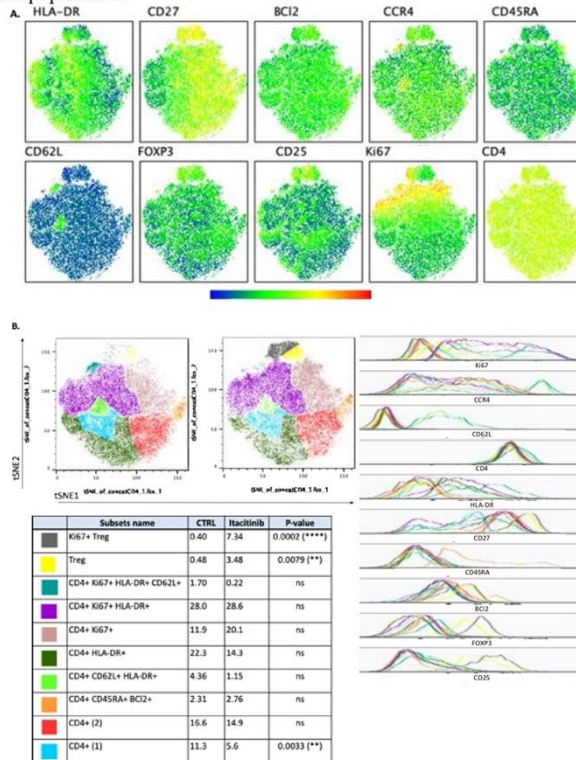
Supplemental figure 7. t-SNE of CD8⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 3 on day 21 after transplantation.

T-SNE were created on 13,600 CD8⁺ T cells and included HLA-DR, CD27, CD62L, Granzyme B, BCL2, CD45RA, CD25 and Ki67 markers. **(A)** Visualization of marker expression (MFI) among CD8 T cells. **(B)** Five populations were determined based on different marker expression (geometric mean), i.e. CD8⁺Ki67⁺GranzymeB⁺CD27⁺ (pink), CD8⁺Ki67⁺CD27⁺ (purple), CD8⁺GranzymeB⁺ (orange), CD8⁺CD45RA⁺Ki67⁺Granzyme B⁺ (light blue), CD8⁺CD27⁺CD45RA⁺GranzymeB⁺CD62L⁺ (light green) in control and treated groups. CD8⁺Ki67⁺CD27⁺ (purple, P=0.0001), CD8⁺CD45RA⁺Ki67⁺GranzymeB⁺ (P=0.0022), and CD8⁺CD27⁺CD45RA⁺GranzymeB⁺CD62L⁺ (light green, P=0.0018) cells were significantly increased in the treated group at day 21 in cohort 3. CD8⁺Ki67⁺GranzymeB⁺CD27⁺ (pink, P=0.0232) and CD8⁺GranzymeB⁺ (orange, P=0.0218) T cells were significantly decreased in the treated group at day 21 in cohort 3. Histograms show subpopulations marker expression.



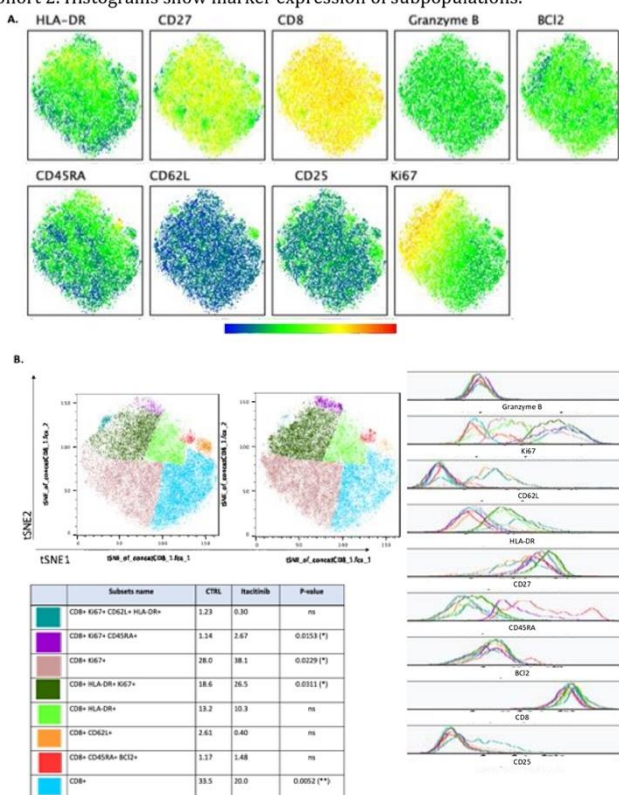
Supplemental figure 8. t-SNE of CD4⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 2 on day 28 after transplantation.

T-SNE were created on 21,000 CD4⁺ T cells and included HLA-DR, CD27, BCL2, CD45RA, CD62L, FOXP3, CD25 and Ki67 markers. **(A)** Visualization of marker expression (MFI) among CD4⁺ T cells. **(B)** Ten populations were determined based on different marker expression (geometric mean), i.e. Ki67⁺Treg (grey), resting Treg (yellow), CD4⁺Ki67⁺HLA-DR⁺CD62L⁺ (blue), CD4⁺Ki67⁺HLA-DR⁺ (purple), CD4⁺Ki67⁺ (beige), CD4⁺HLA-DR⁺ (dark green), CD4⁺CD62L⁺HLA-DR⁺ (light green), CD4⁺CD45RA⁺BCL2⁺ (orange), and other CD4⁺ T-cells (red and light blue) in the control and itacitinib groups. Ki67⁺ Treg (grey, p-value = 0.0002) and Treg (yellow, p-value = 0.0079) were significantly higher in the treated group at day 28 in cohort 2. Other CD4⁺ T cells (light blue) was significantly lower in the treated group at day 28 in cohort 2. Histograms show marker expression of subpopulations.



Supplemental figure 9. t-SNE of CD8⁺ T cells in peripheral blood from mice in cohort 3 on day 21 after transplantation.

T-SNE were created on 20,560 CD8⁺ T cells and includes HLA-DR, CD27, CD62L, Granzyme B, BCL2, CD45RA, CD25 and Ki67 markers. **(A)** Visualization of marker expression (MFI) among CD8⁺ T cells. **(B)** Eight populations were determined based on different marker expression (geometric mean), i.e. CD8⁺Ki67⁺CD62L⁺HLA-DR⁺ (blue), CD8⁺Ki67⁺CD45RA⁺ (purple), CD8⁺Ki67⁺ (beige), CD8⁺HLA-DR⁺Ki67⁺ (dark green), CD8⁺HLA-DR⁺ (light green), CD8⁺CD62L⁺ (orange), CD8⁺CD45RA⁺BCL2⁺ (red), and other CD8⁺ (light blue) in the control and treated groups. CD8⁺Ki67⁺CD45RA⁺ (purple, P=0.0153), CD8⁺Ki67⁺ (beige, P=0.0229), and CD8⁺HLA-DR⁺Ki67⁺ (dark green, P=0.0311) T cells were significantly higher in the treated group at day 28 in cohort 2. Other CD8⁺ cells (light blue) was significantly decreased in the treated group at day 28 in cohort 2. Histograms show marker expression of subpopulations.



**Résultats – partie 2 : Etude comparative de la prise de greffe
et de la pathogenèse de la GVHD entre les souris NSG et les
souris NSG-IL15.**

Comparison of xenogeneic graft-versus-host disease following human PBMC injection in NSG versus in NSG-Tg(Hu-IL15) mice

Justine Courtois¹, Oswin KWAN¹, Joan Somja², Sophie Dubois¹, Alexandre Hego¹, Charline Beguin¹, Lorenzo Canti¹, Coline Daulne¹, Jo Caers¹, Yves Beguin¹, Gregory Ehx¹, Caroline Ritacco¹, Frederic Baron^{1*}

¹Hematology, University of Liège, Belgium, ²CHU Liège, Belgium

Submitted to Journal:
Frontiers in Immunology

Specialty Section:
Alloimmunity and Transplantation

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
1452890

Received on:
21 Jun 2024

Revised on:
08 Aug 2024

Journal website link:
www.frontiersin.org

Scope Statement

The content of our manuscript fit perfectly with Frontiers in Immunology

Conflict of interest statement

The authors declare a potential conflict of interest and state it below

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision

Credit Author Statement

Alexandre Hego: Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Caroline Ritacco:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Charline Beguin:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Coline Daulne:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Frederic Baron:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Grégory Ehx:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Justine Courtois:** Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Methodology, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Jo Caers:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Joan Somja:** Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Lorenzo Canti:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Oswin KWAN:** Conceptualization, Formal Analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Sophie Dubois:** Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Yves Beguin:** Writing - original draft, Writing - review & editing.

Keywords

graft-versus-host disease, GvHD, Xenogeneic, NSG, NSG-TG(HU-IL15), humanized mouse

Abstract

Word count: 298

NOD.Cg-Prkdc^{tm1Sug}/SzJ(NSG) and NOD.Cg-Prkdc^{tm1Sug}/ShiJic (NOG) mice have been widely used as humanized mouse models of graft-versus-host disease (GVHD). In these models, CD8 + T cells require stimulation by IL-2 (which is provided by co-transplanted CD4 + T cells) to induce xenogeneic GVHD. Here, we hypothesized that the use of a mouse strain transgenic for a human cytokine able to stimulate CD8 + T cells (i.e. IL-15) would improve current humanized GVHD models and induce higher human T cell infiltration in classical GVHD-target organs such as the skin, liver and gastro-intestinal tract. **Methods:** To test these hypotheses, we compared xenogeneic GVHD induced by injection of human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in wild-type NSG versus NSG mice expressing human IL-15 (NSG-Tg(Hu-IL15)). **Results:** We observed that, following injection of hPBMC, NSG-Tg(Hu-IL15) mice had higher blood counts of (human) CD4 + and CD8 + T cells at days 14 and 21, a trend towards higher INF- γ serum levels (3327 versus 2892 pg/mL, $P=0.08$) at day 20, more severe GVHD scores, and a shorter survival (median 30 versus 37 days, $P=0.044$) compared with classical NSG mice. In contrast, organ (including skin, liver and colon) infiltration by CD3 + T cells on day 20 was comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice. Further, unbiased flow cytometry analyses on day 20 samples showed comparable CD4 + T-cell subset frequencies in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice, while a cluster of memory T cells expressing granzyme B was more frequent in NSG-Tg(Hu-IL15) mice. **Conclusion:** In summary, our data show that, following injection of hPBMC, NSG-Tg(Hu-IL15) mice exhibit faster human T-cell expansion than NSG mice and develop a slightly exacerbated xGVHD. However, organ infiltration as well as histologic GVHD lesions in the GI tract and the liver were comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice.

Funding information

JuCo, LC and OK are Televie Research Fellows, CB is a Medical Doctor Applicant to an MSc and a Ph.D., GE is a Research Associate, and FB a Senior Research Associate at the National Fund for Scientific Research (F.R.S.-FNRS), Belgium. The study was funded by grants from the F.R.S.-FNRS (grant # T.0016.20), by the University of Liège (ARC # ARC 19/23-16), as well as by the Leon Fredericq fund and the Anti-Cancer Center of the University of Liège. We are grateful to the Imaging and Flow Cytometry and to the Immunohistology platforms of the GIGA for their help with flow cytometry and histology analyses.

Funding statement

The author(s) declare that financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: The animal study was approved by Commission d'éthique animale de l'université de Liège (protocole #2114). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Studies involving human subjects

Generated Statement: Ethical approval was not required for the studies on humans in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable images or data are presented in this study.

Data availability statement

Generated Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

In review

1 **Comparison of xenogeneic graft-versus-host disease**
2 **following human PBMC injection in NSG versus in NSG-**
3 **Tg(Hu-IL15) mice**

4 **Authors:** Justine Courtois^{1*}, Oswin Kwan^{1*}, Joan Somja², Sophie Dubois¹, Alexandre
5 Hego³, Charline Beguin^{1,4}, Lorenzo Canti¹, Coline Daulne¹, Jo Caers^{1,3}, Yves
6 Beguin^{1,4}, Grégory Ehx¹, Caroline Ritacco^{1#}, Frédéric Baron^{1,4#}

7
8 * JuCo and OK share first authorship

9 # CR and FB share last authorship

10

11 **Affiliations:**

12 1: Hematology Research Unit, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique
13 Appliquée (GIGA)-I³, University of Liège, Liège, Belgium;

14 2: Department of Pathology, CHU Liège, Liège, Belgium.

15 3: Cell imaging platform from the GIGA, University of Liège, Liège, Belgium

16 4: Department of Medicine, Division of Hematology, CHU of Liège, Liège, Belgium

17

18 **E-mails:**

19 J.Courtois@uliege.be; okwan@uliege.be; Joan.Somja@chuliege.be; sophie.dubois@chuliege.be;

20 alexandre.hego@uliege.be; charline.beguin@chuliege.be; L.Canti@uliege.be;

21 coline.daulne@uliege.be; jo.caers@chuliege.be; yves.beguin@uliege.be; G.Ehx@uliege.be

22 caroline.ritacco@gmail.com; f.baron@uliege.be.

23

24 **Short title:** xGVHD in NSG or NSG-Tg(Hu-IL15) mice

25

26 **Word count:** abstract: 284 words, manuscript: 3731 words, figures: 6.

27

28 **Keywords:** Graft-versus-host disease, GVHD, xenogeneic, NSG, NSG-Tg(Hu-IL15),
29 humanized mouse.

30

31 **Address for correspondence:** Frédéric Baron; University of Liège, department of
32 Hematology, CHU Sart-Tilman 4000 Liège Belgium. Tel +32 - 4 - 366 72 01; Fax

33 +32 - 4 - 366 88 55; E-mail: f.baron@uliege.be

34 **ABSTRACT**

35 **Background:** NOD.Cg-Prkdc^{scld} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) and NOD.Cg-
36 Prkdc^{scld}Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic (NOG) mice have been widely used as humanized mouse
37 models of graft-versus-host disease (GVHD). In these models, CD8⁺ T cells require
38 stimulation by IL-2 (which is provided by co-transplanted CD4⁺ T cells) to induce
39 xenogeneic GVHD. Here, we hypothesized that the use of a mouse strain transgenic
40 for a human cytokine able to stimulate CD8⁺ T cells (i.e. IL-15) would improve current
41 humanized GVHD models and induce higher human T cell infiltration in classical
42 GVHD-target organs such as the skin, liver and gastro-intestinal tract. **Methods:** To
43 test these hypotheses, we compared xenogeneic GVHD induced by injection of human
44 peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in wild-type NSG versus NSG mice
45 expressing human IL-15 (NSG-Tg(Hu-IL15)). **Results:** We observed that, following
46 injection of hPBMC, NSG-Tg(Hu-IL15) mice had higher blood counts of (human) CD4⁺
47 and CD8⁺ T cells at days 14 and 21, a trend towards higher INF- γ serum levels (3327
48 versus 2892 pg/mL, P=0.08) at day 20, more severe GVHD scores, and a shorter
49 survival (median 30 versus 37 days, P= 0.044) compared with classical NSG mice. In
50 contrast, organ (including skin, liver and colon) infiltration by CD3⁺ T cells on day 20
51 was comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice. Further, unbiased flow cytometry
52 analyses on day 20 samples showed comparable CD4⁺ T-cell subset frequencies in
53 NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice, while a cluster of memory T cells expressing
54 granzyme B was more frequent in NSG-Tg(Hu-IL15) mice. **Conclusion:** In summary,
55 our data show that, following injection of hPBMC, NSG-Tg(Hu-IL15) mice exhibit faster
56 human T-cell expansion than NSG mice and develop a slightly exacerbated xGVHD.
57 However, organ infiltration as well as histologic GVHD lesions in the GI tract and the
58 liver were comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice.
59

60 INTRODUCTION

61 Graft-versus-host disease (GVHD) has remained a major limitation of allogeneic
62 hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT) (1). The disease is caused by donor
63 T cells contained in the graft reacting against host tissues because of genetic
64 disparities between the host and the donor. While mouse-to-mouse models of
65 experimental GVHD provided invaluable insights on GVHD biology, they are limited by
66 important biologic divergences between human and rodent species, fixed genetic
67 backgrounds between donors and recipients, and the use of young mice housed in
68 pathogen-free conditions as donors (2).

69 In the last decades, humanized mouse models of GVHD have extensively been
70 studied, and particularly models in which xenogeneic GVHD (xGVHD) is induced by
71 injecting human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) in NOD.Cg-Prkdc^{scid}
72 Il2rg^{tm1Wjij/SzJ} (NSG) or NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Su9/ShiJic} (NOG) mice (3–8). These
73 models have several advantages compared to classical mouse-to-mouse models of
74 GVHD, including donor genetic diversity, the possibility to use donors of different ages
75 exposed to various pathogens, and the use of human cells to induce GVHD. The
76 relevance of these models is well demonstrated by the fact that many drugs used in
77 the clinic to prevent or treat GVHD in humans are also efficient to prevent xGVHD in
78 humanized mice. These include calcineurin inhibitors (9), mTOR inhibitors (7), post-
79 transplant cyclophosphamide (10,11), CTLA-4-Ig fusion proteins (9), JAK inhibitors
80 (12,13) or the anti-CD26 monoclonal antibody Beigelomab (14). These models have
81 also allowed to assess the ability of human regulatory cells to prevent GVHD (15–23)
82 and to identify T-cell subpopulations favoring it (8,24).

83 In recent years, important advances have been made in our understanding of
84 the pathogenesis of xGVHD induced by injection of hPBMC in NSG or NOG mice. It
85 has been found that the disease is caused by the activation of a fraction of infused
86 human T-cell clones following the trigger of their T-cell receptor (TCR) by mouse
87 dendritic cells (DC) via antigen mimicking (4,6,11,20). Mouse DC also provide the
88 second T-cell activating signal through interactions between mouse CD28 and human
89 T-cell B7 interactions (9). Following these two stimuli, human T cells secrete IL-2, IFN-
90 γ and IL-10 providing the third T-cell activation signal. It should be stressed however
91 that, in these models, CD8⁺ T cells do require stimulation by IL-2 (which can be
92 provided by co-transplanted CD4⁺ T cells) to induce xGVHD. Activated T cells then
93 migrate to xGVHD target organs (mainly the lungs, liver and bone marrow) causing

94 xGVHD (3). In contrast to what occurs in mouse-to-mouse models of GVHD and in
95 humans, the gastro-intestinal (GI) tract and the skin are not primary targets during
96 xenogeneic GVHD reactions. This is a limitation of these models.

97 Here, we hypothesized that the use of a mouse strain, engineered to produce a
98 human cytokine able to stimulate CD8⁺ T cells (i.e. IL-15) would improve current
99 humanized GVHD models and induce higher human T-cell infiltration in classical
100 GVHD target organs such as the skin, liver and gastro-intestinal tract. Indeed, in the
101 B6->B6D2F1 mouse-to-mouse model of GVHD, mice that were transplanted with IL-
102 15 transgenic bone marrow cells had an expansion of effector-memory CD8⁺ T cells,
103 and exacerbated GVHD and more severe cholangiohepatitis and enteritis (25). In
104 contrast, pulmonary inflammation was comparable in mice receiving IL-15 transgenic
105 or wild-type bone marrow cells (25). Supporting these findings, Huarte *et al.* observed
106 that injection of hPBMC in (not previously irradiated) NOG mice expressing hIL-15 led
107 to significant T-cell infiltration in GVHD target organs including GI tract, liver and skin
108 (although no data comparing organ infiltration in NOG and NOG mice expressing hIL-
109 15 were reported in that publication) (12) To test our hypothesis, we compared
110 xenogeneic GVHD induced by injection of hPBMC in NSG versus in NSG-Tg(Hu-IL15)
111 mice.

112

113 MATERIALS AND METHODS

114 Induction and assessment of xGVHD in NSG mice

115 NSG or NSG-Tg(Hu-IL15) mice (The Jackson laboratory, Bar Harbor, ME), aged from
116 10 to 12 weeks, received an i.v. injection of 2×10^7 of hPBMCs to induce xGVHD.
117 PBMCs were harvested from buffy coats by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Freiburg,
118 Germany) gradient centrifugation. The severity of GVHD was studied using a scoring
119 system between 0 (minimum) and 2 (maximum) based on four clinical parameters:
120 weight loss, posture (hunching), mobility, and anemia, as previously reported(17). Mice
121 were monitored daily and assessed for GVHD score thrice weekly during the
122 experiments. Mice with a GVHD score of 6/8 were sacrificed in agreement with the
123 recommendation of our ethical committee (protocol #2114). Dead animals with an
124 ethical limit score reached were kept in the dataset for the remaining time points (last
125 value carried forward). All experimental procedures and protocols used in this study
126 were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics

127 Committee of the University of Liège, Belgium. The "Guide for the Care and Use of
128 Laboratory Animals," prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources,
129 National Research Council, and published by the National Academy Press, was
130 followed.

131

132 Flow cytometry analyses

133 Peripheral blood (PB) samples (150 μ L) were collected on days 14, 21 and 28 post-
134 transplant for the two first cohorts. PB was depleted of erythrocytes using RBC lysis
135 buffer (eBioscience, San-Diego, CA) according to the manufacturer's instructions and
136 analyzed by flow cytometry. The following antibodies were used: anti-mouse CD45
137 (30-F11) PE-CY5 (15-0451-81, eBiosciences), anti-human CD8 (SK1) PE-CY7
138 (2323555, Sony), anti-human CD62L (DREG56) APC-CY7 (47-0629-42,
139 eBiosciences), anti-human CD4 (RPA-T4) Pacific blue (48-0049-42, eBiosciences),
140 anti-human CD45 (H130) BV510 (563204, BD), anti-human HLA-DR (L243) BV605
141 (2138200, Sony), anti-human CD27 (L128) BV650 (563228, BD), anti-human CD45RA
142 (HI100) BV786 (304140, Biolegend), anti-human CD25 (2a3) BUV395 (564034, BD),
143 anti-human CD56 (B159) PE (555516, BD), anti-human CD16 (eBioCB16) biotin (13-
144 0168-82, eBiosciences), streptavidin APC (S868, Invitrogen), anti-human granzyme B
145 (GB11) FITC (560211, BD), anti-human FOXP3 (259D/C7) PE-Texas Red (562421,
146 BD), anti-human KI67 (B56) PERCP-CY5.5 (561284, BD). Cells were incubated with
147 extracellular antibodies for 20 minutes at 4°C in the dark and washed twice with PBS
148 containing 3% of FBS. Intracellular staining for FOXP3, KI67 and Granzyme B was
149 performed by using the FOXP3 Staining Buffer Set (eBioscience) and intracellular
150 antibodies were incubated for 30 minutes at 4°C in the dark. Total cell count of human
151 CD45 cells in blood were calculated based on the absolute number of white blood cells
152 counted in an ABX Micros 60 cell counter (HORIBA ABX SAS) and on human cell
153 chimerism. Data were acquired on a FACS LSRFortessa flow cytometer (BD) and
154 analyzed with the Flowjo software 10.0 (Tree Star Inc., Ashland, OR). In gating
155 strategies, regulatory T cells (Tregs) were defined as CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells while
156 remaining CD4⁺ T cells were termed conventional T cells (Tconv). For the third cohort,
157 at the time of sacrifice on day 20 post-transplantation, PB, spleen, bone marrow (BM),
158 liver and lungs were harvested and analyzed by flow cytometry. Splenocytes were
159 obtained by crushing the spleen. BM cells were obtained by flushing femurs and tibiae.
160 Lung- and liver- infiltrating cells were obtained by mincing and incubating the organs

161 for 1 h in HBSS containing 50 µg/ml of DNase (Roche, Basel, Switzerland) and 1 mg/ml
162 of collagenase A (Roche). The digestion of these organs was stopped by washing
163 twice with PBS containing 10 mM of EDTA (pH = 7.2-7.4), and mononuclear white
164 blood cells were collected by ficoll gradient centrifugation. Cells from all organs were
165 washed twice with PBS containing 3% of FBS and counted in an ABX Micros 60 cell
166 counter (HORIBA ABX SAS) before being labeled with the above-mentioned antibody
167 mix.

168

169 **Unsupervised flow cytometry analyses**

170 These analyses were performed on blood draws and lungs from 16 (8 NSG and 8
171 NSG-Tg(Hu-IL15) mice) mice sacrificed on day 20 after hPBMC infusion. The
172 concatenated data set was analyzed through successive FlowSOM clustering (26) and
173 t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) representation after exporting
174 similar event numbers for each sample per condition group, as previously reported
175 (27–29). A first gate including either 11,995 viable CD4⁺ lymphocytes/mouse or 8,294
176 CD8⁺ lymphocytes/mouse for peripheral blood analyses and 29,934 CD8⁺
177 lymphocytes/mouse for lung analyses and excluding doublets was first used. These
178 numbers corresponded to the minimal cell subset counts obtained in a mouse so that
179 each mouse contributed equally to the analyses. Secondly, additional markers were
180 used to distinguish phenotypic clusters of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, again using
181 FlowSOM and t-SNE. These additional markers included CD27, CD45RA, CD62L,
182 CD25, HLA-DR, FoxP3 and Ki67 for CD4⁺ T cells and CD27, CD45RA, CD62L, CD25,
183 HLA-DR, Granzyme B and Ki67 for CD8⁺ T cells. The characteristics of each identified
184 cluster were assessed by means of histograms and heatmaps. Comparisons between
185 groups (NSG versus NSG-Tg(Hu-IL15) mice) were performed with tests on the cross-
186 entropy distributions of the t-SNE representations of each group as previously reported
187 (29). In brief, for the original and t-SNE space of each t-SNE plot, a probability per data
188 point was calculated following the same approach as in the t-SNE algorithm. From
189 these point probabilities, the distribution of cross-entropy in the t-SNE space relative
190 to the original space was obtained for each group represented in the plot. All pairwise
191 comparisons between groups were evaluated with Kolmogorov–Smirnov tests on the
192 difference between the cross-entropy distributions. Dendrograms were obtained from
193 hierarchical clustering, using as distance the Kolmogorov–Smirnov statistic, which is
194 the L-infinity distance between the cross-entropy distributions.

195

196 **Histological analyses**

197 For the 16 mice sacrificed at day 20 post-transplant, lungs, intestine, skin, and liver
198 were collected, washed with PBS, fixed in 10% formalin (Sigma Aldrich) and routinely
199 processed for paraffin embedding. Immunostaining was performed on 5- μ m sections
200 with hematoxylin-eosin (H&E) and anti-human CD3 (clone PS1; Novocastra/Leica,
201 Newcastle Upon Tyne, UK) DAB staining using a BenchMark XT autostainer (Ventana
202 Medical Systems, Tucson, AZ) for histological examination. Sections from paraffin
203 blocks were mounted on glass slides and stained with the selected marker. The stained
204 slides were scanned at 40x magnification and digitally converted into virtual slides
205 using the Hamamatsu NDP NanoZoomer Digital Pathology slide scanner (Hamamatsu
206 Nanozoomer 2.0HT). Viewing and analyzing the virtual slides was done by using the
207 NDP Viewer. Image analysis (CD3 marker) of each tissue was performed using
208 QuPath version 0.4.3, an open-source and user-friendly software designed for
209 pathology and whole-slide image analysis. Initially, a pixel classifier was trained with a
210 random forest algorithm on a diverse dataset to precisely identify tissue regions in the
211 images. Subsequently, the trained classifier was employed to detect tissues and
212 generate annotations, serving as regions of interest for cell detection. Hematoxylin
213 staining was utilized for cell detection, and the selection of positive cells was based on
214 the mean optical density (OD) of cytoplasm DAB staining for each analyzed tissue.

215 GVHD scores in small bowel, large bowel and liver were graded according to a
216 well-established semiquantitative scoring system for abnormalities known to be
217 associated with GVHD (30). For small bowels, six parameters were scored: villous
218 blunting, crypt regeneration, crypt epithelial cell apoptosis, crypt loss, luminal sloughing
219 of cellular debris, lamina propria inflammatory cell infiltrate, and mucosal ulceration.
220 For large bowels, seven parameters were assessed: crypt regeneration, crypt epithelial
221 cell apoptosis, crypt loss, surface colonocyte vacuolization, surface colonocyte
222 attenuation, lamina propria inflammatory cell infiltrate, and mucosal ulceration. For
223 livers, six parameters were considered: portal tract expansion by an inflammatory cell
224 infiltrate, bile ducts damage (including lymphocytic infiltrate, epithelial cell apoptosis
225 and sloughing), vascular damage, parenchymal damage (including apoptosis,
226 microabscesses and mitotic figures), hepatocellular cholestasis, and hepatocellular
227 steatosis. The scoring system for each parameter that assessed both the extent and

228 severity of tissue damage scored 0 as normal, 0.5 as focal and rare, 1 as focal and
229 mild, 2 as diffuse and mild, 3 as diffuse and moderate, and 4 as diffuse and severe.

230

231 **Serum cytokine levels**

232 Blood samples were collected from NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice and sera were
233 isolated and stored at -80°C until use. IL-2, IL-17/IL-17A, IFN γ , and TNF α serum
234 concentrations were quantified using Human High Sensitivity Cytokine Premixed kit B
235 Magnetic Luminex Performance assay (FCSTM14-05, R&D Systems, Minneapolis,
236 MN) according to the manufacturer's instructions. Analysis of each sample was
237 performed in duplicate. Data were collected and analyzed using a Luminex MAGPIX
238 analyzer (APX1042, ThermoFisher Scientific).

239

240 **Statistical analyses**

241 The Mann-Whitney test was used to compare flow cytometry data between two
242 different groups. Comparisons between GVHD score curves were made using the 2-
243 way ANOVA test. Survival curves were modeled using the Kaplan-Meier methods.
244 Comparisons between groups were made with the log-rank test. Data from all animals
245 were taken into consideration in survival and GVHD score analyses. Data from all
246 animals alive at that time point were taken into consideration for flow cytometry
247 analyses. P-values < 0.05 were considered as statistically significant and all P-values
248 were 2-sided. Statistical analyses were carried out with Graphpad Prism 8.0
249 (Graphpad Software, San Diego, CA).

250

251 **RESULTS**

252 **Xenogeneic GVHD might be slightly exacerbated in NSG-Tg(Hu-IL15) mice**

253 We first compared xGVHD severity in NSG and in NSG-Tg(Hu-IL15) mice in two
254 independent cohorts. Combining data from the two cohorts, we observed that xGVHD
255 severity and lethality were modestly higher in NSG-Tg(Hu-IL15) (n=17) than in NSG
256 mice (n=16) (Figure 1). Specifically, median survival was 37 days in NSG mice versus
257 30 days in NSG-Tg(Hu-IL15) mice (P= 0.044) (Figure 1A). In addition, GVHD scores
258 were significantly lower in NSG than NSG-Tg(Hu-IL15) mice (Figure 1B). However,
259 weight loss curves did not significantly differ between the two groups (Figure 1C).

260 Given that prior publications have observed positive associations between INF-
261 γ and TNF- α levels and xGVHD severity(11,31), we measured serum cytokine levels
262 from NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice on day 20 after hPBMC infusion in a third cohort
263 of 16 mice. It should be noted that, at the time of sacrifice, xGVHD scores and weight
264 loss percentages were comparable between NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice in this
265 third cohort. We observed that NSG-Tg(Hu-IL15) mice tended to have higher INF γ
266 serum levels (3,327 pg/mL versus 2,892 pg/mL, P=0.0848; **Figure 1D**). However,
267 TNF α , IL-17, and IL-2 serum levels were comparable in both groups (**Figure 1E-G**).
268 Taken together, these data suggest that injection of hPBMC result in slightly more
269 severe xGVHD in NSG-Tg(Hu-IL15) than in NSG mice.

270 **T-cell engraftment in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice**

271 We next assessed whether the possibly worsened xGVHD observed in NSG-Tg(Hu-
272 IL15) mice correlated with faster human T-cell engraftment by quantifying blood human
273 immune cells in mice from cohorts 1 and 2 (n=33) on days 14, 21, and 28 after hPBMC
274 injection. We observed higher human hematopoietic cell engraftment in NSG-Tg(Hu-
275 IL15) compared to NSG mice. Specifically, total human CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts
276 in the peripheral blood of transplanted mice were each significantly higher in NSG-
277 Tg(Hu-IL15) than in NSG mice on days 14 and 21 (but not 28) post-transplantation
278 (**Figure 2A-B**). In contrast, Treg numbers were comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-
279 IL15) mice (**Figure 2C**).

280 We then investigated which CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets were most impacted
281 by IL-15 expression on day 20 after transplantation (mice from the third cohort) using
282 a software tool performing FlowSOM(26) clustering on T-SNE plots and comparing t-
283 SNE representations in each group using a cross entropy test (29). We observed that
284 the proportions of the different CD4⁺ T-cell clusters were not significantly different in
285 NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice (p=0.2) (data not shown). In contrast, the proportion
286 of the different CD8⁺ T-cell clusters were significantly different among CD8⁺ T cells (p=
287 1.567e-07). Specifically, a cluster of Ki67⁻ Granzyme^{high} effector memory T cells
288 (cluster #6) was significantly more frequent in NSG-Tg(Hu-IL15) than in NSG mice
289 (p=0.02), while the opposite was seen for a cluster of Ki67⁺ Granzyme⁻ effector
290 memory T cells (cluster #1) (**Figure 3**). These observations suggested that CD8
291 cytotoxicity might be enhanced in in NSG-Tg(Hu-IL15) mice.

292

293 **Organ infiltration**

294 We next compared organ infiltration by human T cells in the lungs, liver, skin, and colon
295 in NSG (n=8) and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice on day 20 after hPBMC infusion in the
296 third cohort. We observed comparable infiltration in the lungs (median 23.3% versus
297 24.9%, P=0.38), liver (median 10.4% versus 9.8%, P=0.51), skin (median 4.6% versus
298 4.2%, P=0.96) and colon (median 0.41% versus 0.38%, P=0.51) in NSG and in NSG-
299 Tg(Hu-IL15) mice, respectively (Figure 4). These results demonstrate that, in contrast
300 to our hypothesis, human T-cell infiltration in classical GVHD target organs such as the
301 skin, liver and gastro-intestinal tract was similar in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice.

302 Finally, we compared the phenotype of CD8⁺ T cells infiltrating the lungs of NSG
303 and in NSG-Tg(Hu-IL15) mice. As observed in the peripheral blood, a cluster of Ki67⁻
304 Granzyme^{high} effector memory T cells (cluster #5) was significantly more frequent in
305 NSG-Tg(Hu-IL15) than in NSG mice (p=0.028) (Figure 5).

306

307 **GI tract and liver pathology**

308 Finally, to further assess the impact of IL-15 expression on GI tract and liver GVHD we
309 compared histologic GVHD scores in small bowel, large bowel and liver in NSG (n=8)
310 and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice on day 20 after hPBMC infusion in the third cohort
311 using a semi-quantitative scoring system including 6 criteria for the small bowel, 7
312 criteria for the large bowel and x criteria for liver pathology (30). We observed that GI
313 tract histological scores were mostly comparable between the two mouse strains with
314 the exception for a higher enterocyte vacuolization score in NSG-Tg(Hu-IL15) mice
315 (Figure 6). Similarly, liver histological scores were comparable with the two mouse
316 strains, confirming that IL-15 expression by NSG mice did not exacerbate liver nor GI
317 tract GVHD.

318

319 **DISCUSSION**

320 Humanized mouse models of GVHD are frequently used to assess potential new
321 GVHD treatments. Here, we hypothesized that the constitutive expression of IL-15
322 would improve current humanized GVHD models and induce higher GVHD in classical

323 GVHD-target organs such as the skin, liver and gastro-intestinal tract, like observed in
324 mouse-to-mouse experimental GVHD (25). To test these hypotheses, we compared
325 xenogeneic GVHD induced by injection of hPBMC in NSG versus in NSG-Tg(Hu-IL15)
326 mice. Several observations were made.

327 The most important finding is that, in contrast to our hypothesis, human T-cell
328 infiltration in GVHD target organs as well as GI tract and liver GVHD histological scores
329 were comparable in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice. These results contrast with
330 those reported by Huarte *et al.* in NOG mice expressing hIL-15, in which significant T-
331 cell infiltration in GVHD target organs (including the GI tract, liver and skin) was
332 observed following hPBMC injection (although no data comparing organ infiltration in
333 NOG and NOG mice expressing hIL-15 were reported in that publication) (12). This
334 apparent discrepancy might be due to the fact that substantially higher levels of hIL-15
335 are present in NOG-mice expressing hIL-15 than in NSG-Tg(Hu-IL15) mice (1.0-4.0
336 ng/mL (<https://www.taconic.com/products/mouse-rat/nog-portfolio/next-generation-nog-models/hil-15-nog>) versus 7.1 +/- 0.3 pg/ml (<https://www.jax.org/strain/030890>)).
337 These results also contrast to prior observations in mouse-to-mouse models of GVHD
338 in which mice transplanted with IL-15 transgenic bone marrow cells had an
339 exacerbated GVHD and more severe cholangiohepatitis and enteritis (25).
340

341 A second observation is that xGVHD was slightly faster in NSG-Tg(Hu-IL15)
342 than in NSG mice in the two independent survival experiments. However, it should be
343 stressed that in the third cohort (sacrificed on day 20), xGVHD scores and weight
344 losses were comparable in both mouse strains, although a trend for higher INF γ levels
345 (a strong correlate of xGVHD severity in humanized models of GVHD (6,7,31)) was
346 observed in NSG-Tg(Hu-IL15) mice. Taken together, these observations suggest that
347 the impact of low-dose hIL-15 expression on xGVHD might be somewhat donor-
348 dependent. The role of IL-15 in GVHD has been extensively studied previously,
349 yielding sometimes conflicting results. In mouse-to-mouse models of GVHD, the
350 absence of donor IL-15 expression reduced GVHD while the opposite was seen when
351 IL-15 was overexpressed by donor cells (25). In humans, high levels of IL-15 two
352 weeks after allo-HCT has been associated with the risk of acute GVHD in patients
353 given grafts after a myeloablative conditioning regimen (32), but not in those
354 transplanted following a reduced-intensity or a truly nonmyeloablative regimen (33,34).

355 In addition, administration of the IL-15 superagonist complex ALT-803 in patients who
356 experienced relapse after allo-HCT induced mild skin acute GVHD in only 7% of
357 treated patients (35). Combined with our observations, these data suggest that IL-15
358 expression/administration might slightly favor GVHD.

359 A third observation is that a cluster of CD8⁺ T cells highly expressing granzyme
360 B was significantly more frequent in the blood and lungs of NSG-Tg(Hu-IL15) mice.
361 While many mouse studies have emphasized that IL-15 is essential for memory CD8⁺
362 T-cell maintenance and self-renewal (36–38), IL-15 has been shown to increase
363 granzyme B expression (and INF- γ production) by human CD8⁺ T cells (39). This is
364 consistent with the signature CD8⁺ memory T-cell cluster identified in our study, and
365 might suggest that CD8⁺ T cells from NSG-Tg(Hu-IL15) mice might be more prone to
366 induce GVHD.

367 The common γ c cytokine receptor family of cytokines include IL-2, IL-4, IL-7, IL-
368 9, IL-15 and IL-21. These cytokines modulate T-cell survival, activation, proliferation
369 and differentiation. Their role on the pathogenesis of xGVHD in NSG mice infused with
370 hPBMC is well established. Indeed blocking common γ c cytokine in NSG mice infused
371 with hPBMC prevented xGVHD and significantly decreased histologic signs of GVHD
372 in the acute-GVHD target organs (40). Since IL-15 expression failed to promote organ
373 infiltration and histologic GVHD severity in classical acute GVHD organs (skin, GI tract
374 and liver), future research should investigate whether other human γ c cytokine could
375 achieve this goal. Expression of high-doses of human IL-2 or IL-10 (which is not a γ c
376 receptor cytokine) have been shown to expand human T cells and exacerbate xGVHD
377 in NSG mice infused with hPBMC (41,42). Unfortunately, organ infiltration and
378 pathology were not reported in these publications. Similarly, administration of low-dose
379 IL-2 in NSG mice infused with hPBMC tended to favor xGVHD despite of promoting
380 Treg expansion, and resulted in the expansion of CD8⁺CD25⁺ T cells (11,43). Finally,
381 of importance, IL-21 blockade in NSG mice infused with hPBMC attenuated xGVHD
382 and decreased liver GVHD histologic scores, suggesting that IL-21
383 expression/administration might increase GVHD severity in classical acute GVHD
384 target organs (44).

385 There are limitations in our study. First, we elected comparing xGVHD in non-
386 irradiated NSG versus NSG-Tg(Hu-IL15) mice. Since prior irradiation impact human

387 cell engraftment in NSG mice, we cannot exclude that human T cell homing to the GI
388 tract would be increased in conditioned NSG-Tg(Hu-IL15) mice. Another limitation of
389 our study is that we did not compare graft-versus-leukemia effects induced by hPBMC
390 infusion in the two mouse strains. Indeed, large numbers of mice would be required to
391 demonstrate stronger GvL effects in NSG-Tg(Hu-IL15) mice since GvL effects are
392 already strong in wild-type NSG mice (7,8,11,13,31), while IL-15 administration has
393 already been shown to promote graft-versus-leukemia effects in the clinic (35).

394 In summary, our data indicate that although NSG-Tg(Hu-IL15) mice appear to
395 develop a slightly more severe xGVHD than conventional NSG mice when injected
396 with hPBMC, T-cell infiltration in GVHD target organs were comparable in both mouse
397 strains.

398 **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

399 Design of the project: FB, JuCo, CR

400 Inputs on the project design: GE, JoCa

401 Mouse experiments: JuCo, CR, SD, LC, CB, CD

402 Flow cytometry experiments and interpretations: JuCo, CR, OK

403 Histology: AH, JS, JuCo

404 Figures: JuCo, OK, AH, FB

405 Ms writing: main: FB, contribution: JuCo.

406 Ms editing and approval: all authors

407

408 **ACKNOWLEDGEMENTS**

409 JuCo, LC and OK are Televie Research Fellows, CB is a Medical Doctor Applicant to
410 an MSc and a Ph.D., GE is a Research Associate, and FB a Senior Research
411 Associate at the National Fund for Scientific Research (F.R.S.–FNRS), Belgium. The
412 study was funded by grants from the F.R.S.–FNRS (grant # T.0016.20), by the
413 University of Liège (ARC # ARC 19/23-16), as well as by the Leon Fredericq fund and
414 the Anti-Cancer Center of the University of Liège. We are grateful to the Imaging and
415 Flow Cytometry and to the Immunohistology platforms of the GIGA for their help with
416 flow cytometry and histology analyses.

417

418 **DECLARATION OF INTERESTS**

419 The authors declare that the research was conducted in the absence of any
420 commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of
421 interest.

422

423 REFERENCES

- 424 1. Baron F, Labopin M, Tischer J, Raiola AM, Vydra J, Blaise D, et al. GVHD occurrence
425 does not reduce AML relapse following PTCy-based haploidentical transplantation: a study
426 from the ALWP of the EBMT. *J Hematol Oncol*. 13 févr 2023;16(1):10.
- 427 2. Socié G, Kean LS, Zeiser R, Blazar BR. Insights from integrating clinical and preclinical
428 studies advance understanding of graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 15 juin 2021;131(12).
- 429 3. King MA, Covassin L, Brehm MA, Racki W, Pearson T, Leif J, et al. Human peripheral
430 blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor
431 gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of
432 host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol*. juill 2009;157(1):104-18.
- 433 4. Kawasaki Y, Sato K, Hayakawa H, Takayama N, Nakano H, Ito R, et al. Comprehensive
434 Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human
435 Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic
436 Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow*
437 *Transplant*. août 2018;24(8):1563-74.
- 438 5. Kawasaki Y, Sato K, Nakano H, Hayakawa H, Izawa J, Takayama N, et al. Alloreactive
439 T Cells Display a Distinct Chemokine Profile in Response to Conditioning in Xenogeneic
440 GVHD Models. *Transplantation*. sept 2019;103(9):1834-43.
- 441 6. Ehx G, Somja J, Warnatz HJ, Ritacco C, Hannon M, Delens L, et al. Xenogeneic Graft-
442 Versus-Host Disease in Humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHD Mice. *Front Immunol*.
443 2018;9:1943.
- 444 7. Ehx G, Ritacco C, Hannon M, Dubois S, Delens L, Willems E, et al. Comprehensive
445 Analysis of the Immunomodulatory Effects of Rapamycin on Human T Cells in Graft-versus-
446 Host Disease Prophylaxis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 29
447 janv 2021;21(8):2662-74.
- 448 8. Delens L, Ehx G, Somja J, Vrancken L, Belle L, Seidel L, et al. In Vitro Th17-Polarized
449 Human CD4(+) T Cells Exacerbate Xenogeneic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood*
450 *Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. févr 2019;25(2):204-15.
- 451 9. Søndergaard H, Kvist PH, Haase C. Human T cells depend on functional calcineurin,
452 tumour necrosis factor- α and CD80/CD86 for expansion and activation in mice. *Clin Exp*
453 *Immunol*. mai 2013;172(2):300-10.
- 454 10. Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, Bolaños-Meade J, Thoburn C, Perkins B, et al.
455 Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to
456 posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 13 nov 2013;5(211):211ra157.
- 457 11. Ritacco C, Köse MC, Courtois J, Canti L, Beguin C, Dubois S, et al. Post-transplant
458 cyclophosphamide prevents xenogeneic graft-versus-host disease while depleting proliferating
459 regulatory T cells. *iScience*. 17 mars 2023;26(3):106085.
- 460 12. Huarte E, Peel M, Juvekar A, Dubé P, Sarah S, Stephens L, et al. Ruxolitinib, a
461 JAK1/JAK2 selective inhibitor, ameliorates acute and chronic steroid-refractory GvHD mouse
462 models. *Immunotherapy*. août 2021;13(12):977-87.
- 463 13. Courtois J, Ritacco C, Dubois S, Canti L, Vandenhove B, Seidel L, et al. Itacitinib
464 prevents xenogeneic GVHD in humanized mice. *Bone Marrow Transplant*. 25 juin
465 2021;56:2672-81.

- 466 14. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C. Prevention of
467 acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol.*
468 juill 2013;162(2):263-77.
- 469 15. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, et al. Generation
470 and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host
471 disease. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* juin
472 2011;11(6):1148-57.
- 473 16. Bruck F, Belle L, Lechanteur C, de Leval L, Hannon M, Dubois S, et al. Impact of bone
474 marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host
475 disease. *Cytotherapy.* mars 2013;15(3):267-79.
- 476 17. Hannon M, Lechanteur C, Lucas S, Somja J, Seidel L, Belle L, et al. Infusion of clinical-
477 grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease.
478 *Transfusion (Paris).* févr 2014;54(2):353-63.
- 479 18. Cuende J, Liénart S, Dedobbeleer O, van der Woning B, De Boeck G, Stockis J, et al.
480 Monoclonal antibodies against GARP/TGF- β 1 complexes inhibit the immunosuppressive
481 activity of human regulatory T cells in vivo. *Sci Transl Med.* 22 avr 2015;7(284):284ra56.
- 482 19. Gregoire C, Ritacco C, Hannon M, Seidel L, Delens L, Belle L, et al. Comparison of
483 Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-
484 Disease in a Humanized Mouse Model. *Front Immunol.* 2019;10:619.
- 485 20. Coman T, Rossignol J, D'Aveni M, Fabiani B, Dussiot M, Rignault R, et al. Human
486 CD4- invariant NKT lymphocytes regulate graft versus host disease. *Oncoimmunology.*
487 2018;7(11):e1470735.
- 488 21. Janikashvili N, Gérard C, Thébault M, Brazdova A, Boibessot C, Cladière C, et al.
489 Efficiency of human monocyte-derived suppressor cell-based treatment in graft-versus-host
490 disease prevention while preserving graft-versus-leukemia effect. *Oncoimmunology.* 19 févr
491 2021;10(1):1880046.
- 492 22. Alhaj Hussen K, Michonneau D, Biajoux V, Keita S, Dubouchet L, Nelson E, et al.
493 CD4(+)CD8(+) T-Lymphocytes in Xenogeneic and Human Graft-versus-Host Disease. *Front*
494 *Immunol.* 2020;11:579776.
- 495 23. Boucault L, Lopez Robles MD, Thiolat A, Bézie S, Schmueck-Henneresse M, Braudeau
496 C, et al. Transient antibody targeting of CD45RC inhibits the development of graft-versus-host
497 disease. *Blood Adv.* 9 juin 2020;4(11):2501-15.
- 498 24. Ito R, Katano I, Kawai K, Yagoto M, Takahashi T, Ka Y, et al. A Novel Xenogeneic
499 Graft-Versus-Host Disease Model for Investigating the Pathological Role of Human CD4(+) or
500 CD8(+) T Cells Using Immunodeficient NOG Mice. *Am J Transplant Off J Am Soc*
501 *Transplant Am Soc Transpl Surg.* mai 2017;17(5):1216-28.
- 502 25. Blaser BW, Roychowdhury S, Kim DJ, Schwind NR, Bhatt D, Yuan W, et al. Donor-
503 derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease. *Blood.* 15 janv
504 2005;105(2):894-901.
- 505 26. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T,
506 et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry
507 data. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* juill 2015;87(7):636-45.
- 508 27. Neumann J, Prezzemolo T, Vanderbeke L, Roca CP, Gerbaux M, Janssens S, et al.
509 Increased IL-10-producing regulatory T cells are characteristic of severe cases of COVID-19.
510 *Clin Transl Immunol.* 2020;9(11):e1204.
- 511 28. Canti L, Humblet-Baron S, Desombere I, Neumann J, Pannus P, Heyndrickx L, et al.
512 Predictors of neutralizing antibody response to BNT162b2 vaccination in allogeneic
513 hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Hematol Oncol.* 24 oct 2021;14(1):174.
- 514 29. Roca CP, Burton OT, Neumann J, Tareen S, Whyte CE, Gergelits V, et al. A cross
515 entropy test allows quantitative statistical comparison of t-SNE and UMAP representations.

516 Cell Rep Methods [Internet]. 23 janv 2023 [cité 14 févr 2023];3(1). Disponible sur:
517 <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100390>

518 30. Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, Bungard D, Brinson YS, Delmonte JJ, et al. Tumor
519 necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the
520 severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* 15 nov
521 1998;102(10):1882-91.

522 31. Ehx G, Fransolet G, de Leval L, D'Hondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacytidine
523 prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-
524 leukemia effects. *Oncoimmunology.* 2017;6(5):e1314425.

525 32. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, Trauet J, Coiteux V, Jouet JP, et al. Plasma levels
526 of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both
527 acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant.* oct 2010;45(10):1546-52.

528 33. De Bock M, Fillet M, Hannon M, Seidel L, Merville MP, Gothot A, et al. Kinetics of
529 IL-7 and IL-15 levels after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation following
530 nonmyeloablative conditioning. *PLoS One.* 2013;8(2):e55876.

531 34. Thiant S, Labalette M, Trauet J, Coiteux V, de Berranger E, Dessaint JP, et al. Plasma
532 levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute
533 GVHD. *Bone Marrow Transplant.* oct 2011;46(10):1374-81.

534 35. Romee R, Cooley S, Berrien-Elliott MM, Westervelt P, Verneris MR, Wagner JE, et al.
535 First-in-human phase I clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat
536 relapse after transplantation. *Blood.* 7 juin 2018;131(23):2515-27.

537 36. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J. Interleukin 15 controls both
538 proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med.* 7 oct
539 2002;196(7):935-46.

540 37. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of
541 CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science.* 28 avr 2000;288(5466):675-8.

542 38. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of
543 memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity.* mai 1998;8(5):591-9.

544 39. Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, van Lier RAW. IL-15 induces antigen-independent
545 expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood.* 1 oct
546 2003;102(7):2541-6.

547 40. Le Floch A, Nagashima K, Birchard D, Scott G, Ben LH, Ajithdoss D, et al. Blocking
548 common γ chain cytokine signaling ameliorates T cell-mediated pathogenesis in disease
549 models. *Sci Transl Med.* 11 janv 2023;15(678):eabo0205.

550 41. Abraham S, Pahwa R, Ye C, Choi JG, Pahwa S, Jaggaiahgari S, et al. Long-term
551 engraftment of human natural T regulatory cells in NOD/SCID IL2ryc(null) mice by expression
552 of human IL-2. *PLoS One.* 2012;7(12):e51832.

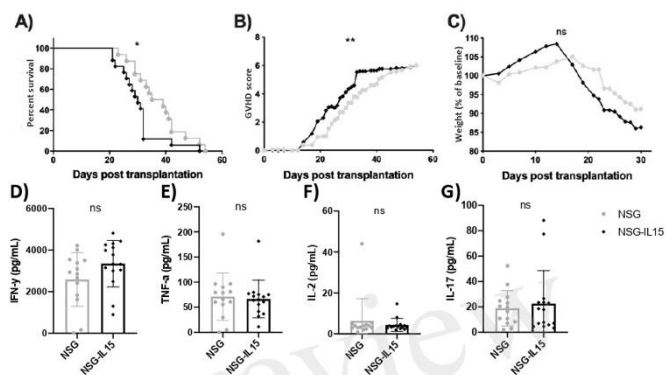
553 42. Abraham S, Guo H, Choi JG, Ye C, Thomas MB, Ortega N, et al. Combination of IL-
554 10 and IL-2 induces oligoclonal human CD4 T cell expansion during xenogeneic and allogeneic
555 GVHD in humanized mice. *Heliyon.* avr 2017;3(4):e00276.

556 43. Pérol L, Martin GH, Maury S, Cohen JL, Piaggio E. Potential limitations of IL-2
557 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunol Lett.*
558 déc 2014;162(2 Pt B):173-84.

559 44. Hippen KL, Bucher C, Schirm DK, Bearl AM, Brender T, Mink KA, et al. Blocking IL-
560 21 signaling ameliorates xenogeneic GVHD induced by human lymphocytes. *Blood.* 12 janv
561 2012;119(2):619-28.

562

563



566

567

Figure 1. NSG-Tg(Hu-IL15) mice developed more severe xGVHD than NSG mice after i.v. infusion of 2×10^7 human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC). Survival (A), GVHD scoring (B), and weight loss by day 30 after hPBMC infusion (C) in NSG (n=16) and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=17) mice from cohorts 1 and 2 combined (n=33). (D-G) Measurements of blood cytokine levels on day 20 after hPBMC infusion in NSG (n=8) or NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice from cohort #3. * means p value <0.05; ** means p value <0.01, ns means p value > 0.05.

570

571

572

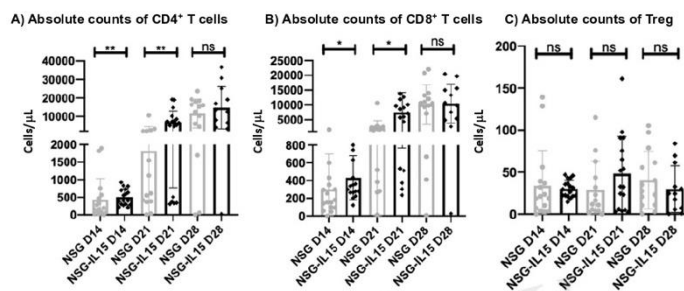
573

574

575

576

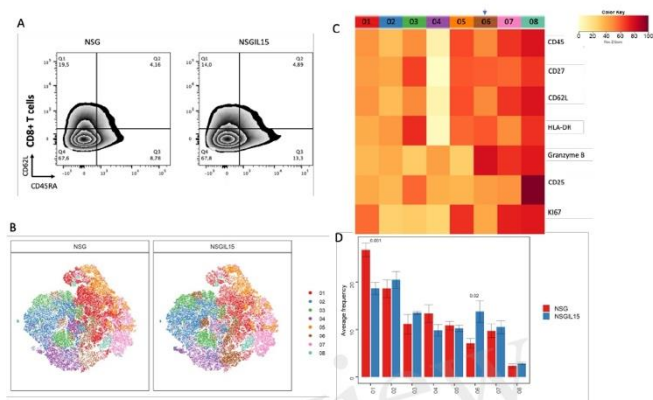
577 **Figure 2**
578



579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

Figure 2. Analysis of human immune cell engraftment in mice from cohorts #1 and #2 on days 14 (n=16 in NSG group and n=17 in NSG-Tg(Hu-IL15) group), 21 (n=15 in NSG group and n=17 in NSG-Tg(Hu-IL15) group), and 28 (n=14 in NSG group and n=12 in NSG-Tg(Hu-IL15) group) after transplantation. (A) Absolute counts of CD4⁺ T cells. (B) Absolute counts of CD8⁺ T cells. (C) Absolute counts of regulatory T cells (Treg). The Mann-Whitney test was used to compare absolute counts in the two groups. * means p value <0.05; ** means p value <0.01, ns means p value > 0.05.

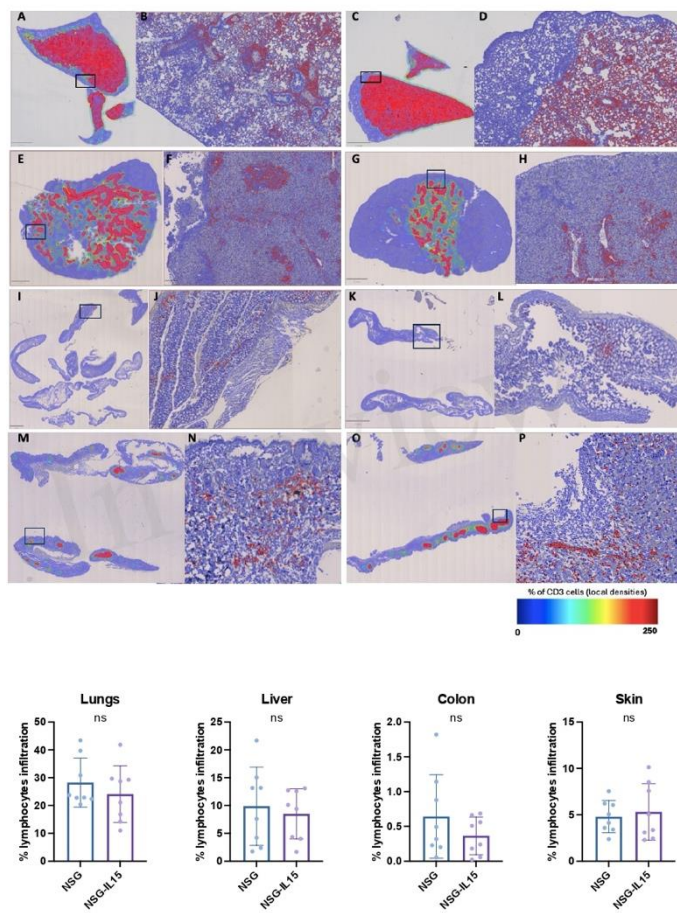
591 **Figure 3**



592
593
594

595 **Figure 3. Peripheral blood CD8⁺ T-cell engraftment on day 20 after hPBMC**
596 **infusion in NSG (n=8) and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice from cohort #3. (A)**
597 **Concatenated representation of the proportion of naive T cells (CD45RA⁺CD62L⁺),**
598 **central memory T cells (CD45RA^{neg}CD62L⁺), effector memory T cells**
599 **(CD45RA^{neg}CD62L^{neg}) and TEMRA (CD45RA⁺CD62^{neg}). (B) t-SNE / FlowSOM**
600 **representation(29) of cell populations based on the expression of the phenotypic**
601 **markers CD45RA, CD27, CD62L, HLA-DR, CD27, Granzyme B, CD25, and Ki67.**
602 **FlowSOM clusters were annotated based on (C) expression of phenotypic markers**
603 **across each cluster. Kolmogorov–Smirnov statistics p-value = 1.567e-07. (D)**
604 **Comparison of cluster frequencies between in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice (p**
605 **values were calculated with the Mann-Whitney test).**
606

607 **Figure 4**



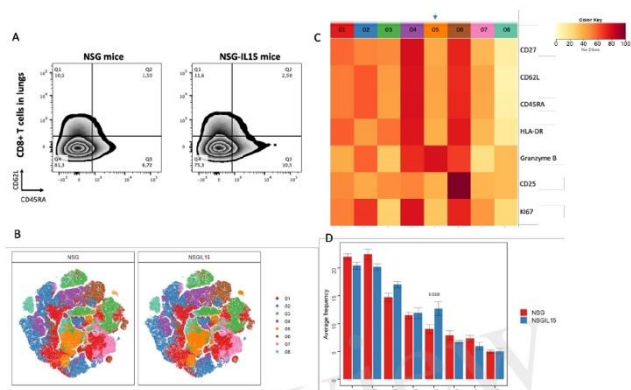
608

609 **Figure 4. Lymphocyte infiltration in lungs, liver, intestine, and skin.** Each pixel in
610 the density map represents the number of chosen objects within the defined radius.
611 Heatmap of CD3 infiltration in histological sections corresponding to the lung of NSG
612 mice (**A**) and to the lung of NSG-Tg(Hu-IL15) mice (**C**) at a 40x magnification.
613 Enlargement of the rectangular area in **A** at a 400x magnification (**B**). Enlargement of
614 the rectangular area in **C** at a 400x magnification (**D**). Heatmap of CD3 infiltration of
615 histological section corresponding to liver of NSG mice (**E**) and to liver of NSG-Tg(Hu-
616 IL15) mice (**G**) at a 40x magnification. Enlargement of the rectangular area in **E** at a
617 400x magnification (**F**). Enlargement of the rectangular area in **G** at a 400x
618 magnification (**H**). Heatmap of CD3 infiltration of histological section corresponding to
619 colon of NSG mice (**I**) and to colon of NSG-Tg(Hu-IL15) mice (**K**) at a 40x
620 magnification. Enlargement of the rectangular area in **I** at a 400x magnification (**J**).
621 Enlargement of the rectangular area in **K** at a 400x magnification (**L**). Heatmap of CD3
622 infiltration of histological section corresponding to skin of NSG mice (**M**) and to skin of
623 NSG-Tg(Hu-IL15) mice (**O**) at a 40x magnification. Enlargement of the rectangular
624 area in **M** at a 400x magnification (**N**). Enlargement of the rectangular area in **O** at a
625 400x magnification (**P**). (**Q**) Image analysis of the percentage of T cells (CD3 marker)
626 infiltration in lungs, liver, colon and skin in mice from cohorts #3 on days 20 (n=8 in
627 NSG group and n=8 in NSG-IL15 group) after transplantation was performed using
628 QuPath version 0.4.3.

629
630

In review

631 **Figure 5**
 632

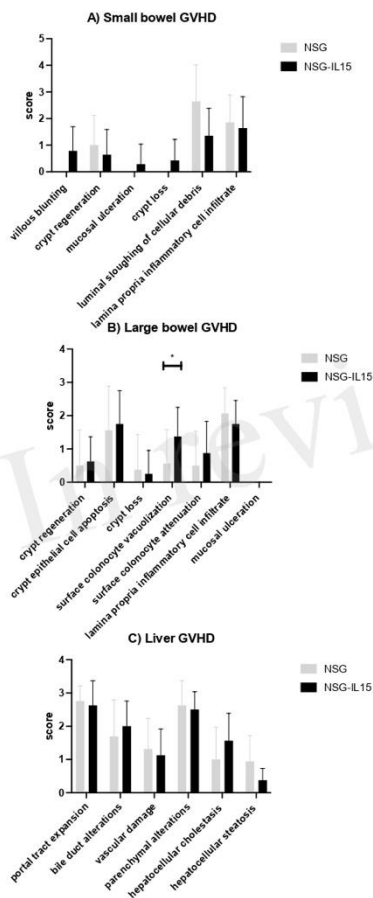


633
 634
 635
 636
 637
 638
 639
 640
 641
 642
 643
 644
 645
 646
 647
 648

Figure 5. CD8⁺ T-cell infiltrating the lungs on day 20 after hPBMC infusion in NSG (n=8) and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice from cohort #3. (A) Concatenated representation of the proportion of naive T cells (CD45RA⁺CD62L⁺), central memory T cells (CD45RA^{neg}CD62L⁺), effector memory T cells (CD45RA^{neg}CD62L^{neg}) and TEMRA (CD45RA⁺CD62L^{neg}). **(B)** t-SNE / FlowSOM representation(29) of cell populations based on the expression of the phenotypic markers CD45RA, CD27, CD62L, HLA-DR, CD27, Granzyme B, CD25, and Ki67. FlowSOM clusters were annotated based on **(C)** expression of phenotypic markers across each cluster. Kolmogorov–Smirnov statistics p-value < 2.2e-16 **(D)** Comparison of cluster frequencies between in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15) mice (p-values were calculated with the Mann-Whitney test).

649 Figure 6.

Figure 6



650

651

652 **Figure 6. Comparable intestinal and liver damage in NSG and NSG-Tg(Hu-IL15).**

653 Organ damage in small bowels (A), large bowels (B) and livers (C) were quantified

654 using a semiquantitative GVHD pathology scoring system on day 20 after hPBMC

655 infusion in NSG (n=8) and NSG-Tg(Hu-IL15) (n=8) mice from cohort #3.

Conclusions

Conclusions

Partie 1 : Etude de l'Itacitinib

Les maladies hématologiques telles que les leucémies, les lymphomes et les anémies sévères nécessitent la plupart du temps une greffe de CSH pour restaurer la fonction normale de la moelle osseuse. Cependant, ce traitement peut conduire à développer une GVHD dans laquelle les cellules immunitaires du donneur attaquent les tissus du receveur. Afin de prévenir le développement de la GVHD et le rejet du greffon, un conditionnement standard est donc mis en place ainsi qu'une prophylaxie médicamenteuse contre la GVHD. Malheureusement, l'utilisation de ces agents immunosuppresseurs est associée à plusieurs effets indésirables, notamment la cytopénie, des troubles métaboliques, une susceptibilité accrue aux infections ainsi que d'autres complications liées au système immunitaire. Face à ces défis, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques devient primordiale.

Dans ce contexte, notre étude sur l'Itacitinib avait pour but d'atténuer les complications associées à la transplantation de CSH et à optimiser les résultats pour les patients souffrant de maladies hématologiques graves. Cette étude nous a donc permis d'explorer la pathogenèse de la GVHD xénogénique induite par l'infusion de PBMCs humaines dans des souris NSG. Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière plusieurs observations significatives. Tout d'abord, l'observation principale démontrée est que l'Itacitinib atténue la GVHD xénogénique dans notre modèle de souris

humanisées. Cependant, il a également été mis en évidence que les avantages de l'Itacitinib peuvent dépendre du donneur ce qui souligne la variabilité de la GVHD xénogénique dans ce modèle de souris humanisées. Ensuite, il a été établi que l'Itacitinib possède une influence dynamique sur le développement et la prolifération des lymphocytes T et des Tregs. En effet, l'Itacitinib permet de réduire le nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ après l'infusion de PBMCs humaines ainsi qu'une augmentation de la fréquence des Tregs. De plus, une production accrue d'IL-2 par les cellules T CD4+ traitées à l'Itacitinib a été observée suggérant que la signalisation de l'IL-2 par JAK3 prédomine pour l'homéostasie des Tregs dans notre modèle de souris humanisées. Dès lors, l'Itacitinib comme traitement post-greffe dans le traitement de la GVHD semblerait effectivement ouvrir une potentielle perspective pour remplacer le traitement standard à base de corticostéroïdes ou pour être combiné à ce dernier. Néanmoins, nos données ont également démontré que l'Itacitinib pourrait diminuer l'effet GvT, qui est médié par les lymphocytes T. Ce risque est donc à prendre en considération. De plus, il est important de souligner que nous n'avons pas observé de différence significative entre les groupes lors de l'étude pour l'analyse GvT mais le nombre de souris utilisé était limité, car ce n'était pas l'objectif principal de l'étude.

L'étude GRAVITAS-301, est un essai clinique de phase III, randomisé, multicentrique, en double aveugle. Son objectif était d'étudier l'efficacité et la sécurité de l'Itacitinib par rapport à un traitement placebo en association avec des corticostéroïdes pour le traitement initial de la GVHD. Pour cette étude, 439 patients ont été

randomisés pour recevoir soit l'Itacitinib plus des corticostéroïdes (n=219), soit un placebo plus des corticostéroïdes (n=220). Au départ, 24% des patients (23% du groupe Itacitinib et 25% du groupe placebo) présentaient une GVHD aiguë. L'ORR au jour 28 était de 74% pour les patients randomisés dans le groupe Itacitinib et de 66% pour ceux randomisés dans le groupe placebo (P=0.078), le niveau de significativité statistique n'était donc pas atteint avec ce protocole. Les taux de réponse complète était de 53% dans le groupe Itacitinib et de 40% dans le groupe placebo.–Des effets indésirables de grade 3 ou plus sont survenus chez 86% des patients traités par l'Itacitinib et chez 82% des patients traités par placebo. Les effets indésirables les plus fréquents étaient une thrombocytopénie ou la diminution du nombre de plaquettes, une neutropénie ou la diminution du nombre de neutrophiles, une anémie et une hyperglycémie. Des décès liés au traitement sont survenus chez 1% des patients du groupe Itacitinib et chez 2% dans le groupe placebo. Les chercheurs ont donc déduit que l'amélioration observée de l'ORR au jour 28 avec l'adjonction de l'Itacitinib aux corticostéroïdes n'avait pas atteint le niveau de significativité escompté au cours de cette étude (Zeiser *et al.*, 2022). Ceci pourrait être attribué au fait que de nombreux médicaments affectent la pharmacocinétique de l'Itacitinib chez l'homme et qu'une proportion significative des patients du groupe recevant l'Itacitinib a été exposée à des niveaux insuffisants du médicament. De plus, le design de l'étude qui prévoyait l'association avec des doses élevées de corticostéroïdes et visait à obtenir une augmentation significative (+16%) de l'ORR au jour 28 n'était probablement pas optimal.

Une autre étude clinique dirigée par A. Etra et son équipe a également examiné l'hypothèse selon laquelle l'administration d'Itacitinib pourrait constituer un traitement efficace pour la GVHD à faible risque sans l'utilisation de corticostéroïdes. Dans le cadre d'un essai multicentrique de phase II (NCT03846479), 70 patients ont été traités pendant 28 jours avec de l'Itacitinib à raison de 200 mg/j et leurs résultats ont été comparés à ceux de 140 patients témoins traités par des corticostéroïdes à la même époque. Dans cette étude, le groupe traité avec de l'Itacitinib a développé moins d'infection grave dans les 90 jours post-HSCT en raison d'un nombre moins élevé d'infections virales et fongiques. Concernant les cytopénies de grade ≥ 3 , leur fréquence était similaire entre les deux groupes, à l'exception d'une leucopénie moins sévère observée dans le groupe traité avec de l'Itacitinib. Aucune différence significative entre les deux groupes à 1 an n'a été observée pour la mortalité hors rechute. L'Itacitinib en monothérapie, sur une courte période, semble donc être une alternative sûre et efficace au traitement par corticostéroïdes de la GVHD pour les patients diagnostiqués avec une GVHD aiguë à faible risque (Etra *et al.*, 2023). Ces résultats corroborent nos observations antérieures, confirmant l'efficacité de l'Itacitinib en monothérapie dans le traitement de la GVHD. Cependant, nos résultats mettent en évidence la nécessité de considérer la variabilité des donneurs ainsi que la complexité des interactions entre l'IL-15 et la GVHD lors de la conception de modèles murins pour étudier la GVHD et ses traitements potentiels.

Soulignons, néanmoins, le fait que bien que nos résultats soient prometteurs, des études supplémentaires avec des échantillons plus importants sont nécessaires pour confirmer l'efficacité et la sécurité de l'Itacitinib, particulièrement en ce qui concerne l'effet GvT. Ces études futures devraient intégrer des analyses statistiques plus rigoureuses pour mieux évaluer l'impact global de l'Itacitinib sur la GVHD et l'effet GvT. Il faut néanmoins souligner que l'incidence de rechute était comparable dans le bras Itacitinib et le bras Placebo dans l'étude GRAVITAS-301 (Zeiser *et al.*, 2022).

En conclusion, bien que l'Itacitinib montre un potentiel considérable pour améliorer les résultats post-transplantation et offrir une alternative ou un complément aux corticostéroïdes, des recherches supplémentaires sont indispensables pour optimiser son utilisation clinique et garantir une évaluation complète de ses effets thérapeutiques et indésirables.

Partie 2 : Etude comparative de la prise de greffe et de la pathogenèse de la GVHD entre les souris NSG et les souris NSG-IL15

Notre étude comparative entre les souris NSG et NSG-IL15 dans le contexte de la GVHD xénogénique met en évidence l'impact de l'IL-15 sur la prise de greffe et la réaction immunitaire post-greffe. Cela souligne l'importance des facteurs environnementaux dans la régulation des réponses immunitaires après transplantation. Les souris NSG-IL15 semblent développer une GVHD xénogénique légèrement plus sévère. Néanmoins, cette tendance est variable en

fonction des donneurs, soulignant une complexité dans le rôle de l'IL-15 dans la GVHD. En effet, l'infiltration des lymphocytes T humains dans les organes cibles de la GVHD (peau, foie, poumon, intestin), malgré la présence de l'IL-15 chez les souris NSG-IL15, était comparable entre les deux types de souris. Néanmoins, chez les souris NSG-IL15, il a été observé un cluster de lymphocytes T CD8+ exprimant fortement le granzyme B dans le sang et les poumons ce qui est cohérent avec le rôle connu de l'IL-15 dans le maintien et la prolifération des lymphocytes T CD8+ mémoires ainsi que dans l'augmentation de l'expression du granzyme B chez les lymphocytes T CD8+. Cette constatation suggère donc potentiellement une différence substantielle dans la réponse immunitaire entre les deux groupes de souris mettant en évidence le rôle de l'IL-15 dans le maintien et la prolifération des lymphocytes T CD8+. Cependant, nos résultats mettent en évidence l'importance de prendre en compte la variabilité du donneur et la complexité des interactions entre l'IL-15 et la GVHD dans la conception des modèles murins dans le cadre de l'étude de la GVHD et de ses traitements potentiels. Il est également important de noter que l'ajout de l'IL-15 dans le système semble avoir un effet marginal, et des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier son rôle exact dans le cadre de la GVHD.

Conclusion générale

Les résultats obtenus lors de nos études ont permis d'enrichir notre compréhension de certains mécanismes sous-jacents à la GVHD

xénogénique dans des modèles de souris humanisées. De plus, ceux-ci suggèrent des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la gestion de la complication majeure qu'est la GVHD à la suite d'une transplantation de CSH. Le but étant d'établir des thérapies ciblées mises au point pour traiter la GVHD tout en conservant l'effet GvT. Dans le contexte de la GVHD, il est important de soulever la relevance de l'utilisation de modèles de souris humanisées. En effet, ces modèles murins permettent de reproduire, de mimer les interactions entre les cellules humaines greffées et l'hôte de manière plus réaliste, offrant ainsi des perspectives précieuses pour le développement de traitements plus efficaces et ciblés contre la GVHD. En outre, ces systèmes offrent la possibilité de tester l'efficacité de nouveaux médicaments et d'étudier les interactions entre les différents compartiments du système immunitaire ce qui ouvre ainsi la voie à des découvertes fondamentales et translationnelles importantes dans le domaine de la transplantation de CSH. C'est pourquoi la création d'un modèle de souris humanisées plus sophistiqué, capable de refléter précisément les interactions immunitaires lors de HSCT, semble être une voie prometteuse pour faire progresser les connaissances sur l'immunobiologie de ce processus. En fin de compte, cette approche pourrait fournir de nouvelles perspectives pour améliorer les résultats cliniques. Dans un domaine où la science progresse continuellement, l'objectif est désormais de développer de nouveaux modèles murins encore plus représentatifs de l'homme, comme suggéré par P. E. Rovatti et son équipe, afin d'affiner notre

compréhension et nos interventions thérapeutiques (Rovatti *et al.*, 2020). Cependant, il est important de souligner trois points essentiels, comme l'a mentionné G. Socié :

- Jusqu'à présent, la modélisation préclinique a été à l'origine de nombreuses avancées dans la compréhension des mécanismes immunologiques en clinique, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles interventions prophylactiques et thérapeutiques.
- À mesure que de nouvelles données émergent, il est impératif de continuer à ajuster les paradigmes actuels ainsi que les approches physiopathologiques.
- Même avec les traitements les plus prometteurs identifiés lors des expériences précliniques, le développement peut être entravé par des hypothèses cliniques ou statistiques erronées concernant les taux de réponse clinique ou de survie ; ainsi que par des populations de patients hétérogènes et insuffisamment stratifiées en fonction des facteurs de risque ou simplement par des essais qui manquent de la puissance statistique nécessaire pour tester les résultats de manière significative (Socié *et al.*, 2021).

En conclusion, les résultats de nos études sur l'Itacitinib ainsi que sur la comparaison entre les modèles murins NSG et NSG-IL15 auront apportés une contribution significative à l'amélioration des résultats cliniques en permettant une meilleure gestion de la GVHD post-transplantation de CSH et en ouvrant la voie à des approches thérapeutiques plus ciblées et personnalisées.

Perspectives

Partie 3 : Etude comparative de la prise de greffe, de la pathogenèse de la GVHD et de l'effet GvT entre les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15.

Partie 3 : Etude comparative de la prise de greffe, de la pathogenèse de la GVHD et de l'effet GvT entre les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15.

Ce projet, similaire au projet 2, s'est concentré sur l'étude comparative entre les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15. Les souris NOD.CB17-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1}/Bcgen, B-NDG, sont une souche spécifique de souris immunodéficientes qui peuvent être utilisées pour l'étude des HSCT, de la régénération du système immunitaire et de l'immunothérapie, tout comme les NSG. En effet, en supprimant le gène IL-2R γ du fond génétique NOD-*scid*, les souris B-NDG qui en résultent manquent de lymphocytes T matures, de lymphocytes B et de cellules NK fonctionnelles. Elles présentent également des déficiences dans la signalisation des cytokines telles que IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21. Cet ensemble de propriétés fait que les souris B-NDG présentent le plus haut degré d'immunodéficiência ce qui les rend plus aptes à la greffe et à la croissance des cellules immunitaires humaines lors de xéno greffe (PBMCs) et de cellules/tissus tumoraux humains.

Concernant les souris B-NDG hIL15 (NOD.CB17-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1}IL15^{tm1(IL15)}/BcgenHsd), ce sont des souris immunodéficientes qui ont été génétiquement modifiées en combinant le fond génétique de la souris B-NDG et exprimant l'IL-15 humaine, tout comme les NSG-IL15 (Raitman *et al.*, 2021). Leur particularité réside dans le fait que le taux d'expression en IL-15 chez les B-NDG hIL15 est 15 fois supérieur par rapport aux NSG-IL15 et 400x

supérieur par rapport aux B-NDG ce qui leur confère probablement le fait d'être un meilleur modèle murin pour notre étude dont l'objectif est de mieux comprendre l'influence de l'IL-15 sur la prise de greffe et la reconstitution immunitaire, notamment sur les cellules NK (Figure 24).

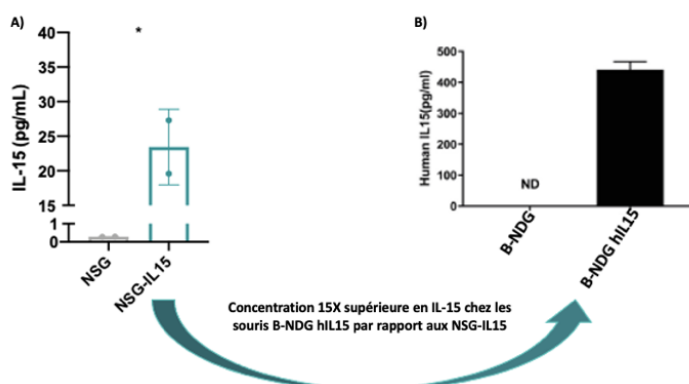


Figure 24. Dosage de l'IL-15 humaine par ELISA sur des échantillons de sérum de souris. A) Résultats confirmant que l'IL-15 humaine est détectable chez les souris NSG-IL15 mais pas chez les souris NSG classiques. B) Résultats confirmant que l'IL-15 humaine est détectable chez les souris B-NDG hIL15 mais pas chez les souris B-NDG. De plus, les souris B-NDG hIL15 présentent un niveau d'expression en hIL-15 15X supérieur par rapport aux souris NSG-IL15. ND = non détectable. Figure réalisée à partir de résultats obtenus par J. Courtois (A) et données disponibles sur le site <https://biocytogen.com/products/immunodeficient-b-ndg-mice/b-ndg-b2m-ko-plus-hil15-mice/> (B).

Sur ces souches de souris dans le cadre de notre étude, une attention particulière a été portée au développement de la GVHD et à l'effet GvT. Cette évaluation a été réalisée en utilisant des paramètres prédéfinis et décrits dans le but de préciser l'impact de l'IL-15 sur ces aspects. Ces analyses approfondies viseront à élargir notre compréhension des interactions complexes entre l'IL-15, le système immunitaire et les résultats post-HSCT.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé 22 souris B-NDG et 22 souris B-NDG hIL15 donc la moitié de chaque groupe a été irradiée la veille de la greffe de la xénotransplantation. Le jour de la greffe, les souris irradiées ont reçu 2 millions de PBMCs humaines tandis que les souris non irradiées ont reçu 20 millions de PBMCs humaines. Ensuite, la prise de greffe, la reconstitution immunitaire et le développement de la pathogenèse de la GVHD ont été évalués. Des prises de sang ont été faites aux jours 14, 21 et 28 post-greffe afin de réaliser un immunomarquage pour étudier les différentes sous-populations immunitaires. Les souris seront suivies quotidiennement et scorées 3 fois par semaine selon des critères définis pour caractériser la GVHD tels que la posture, l'anémie, la perte de poids et la perte de mobilité (Figure 25).

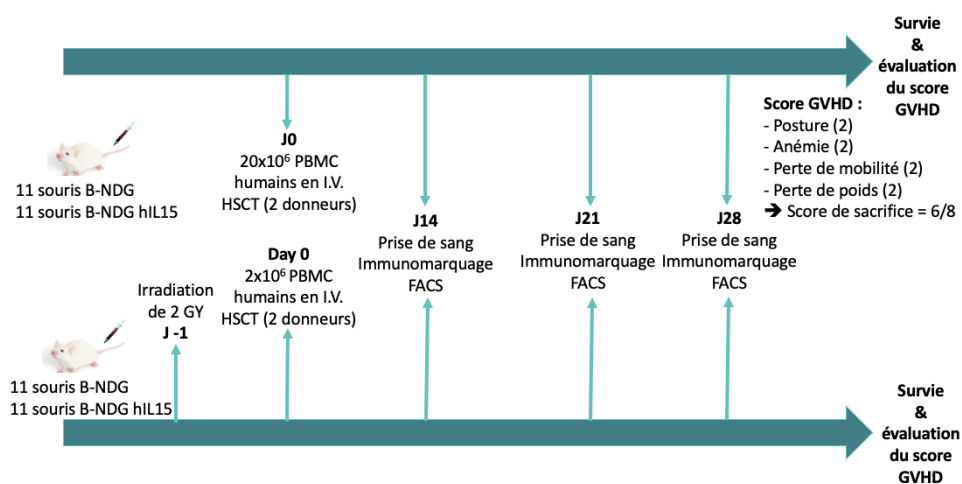
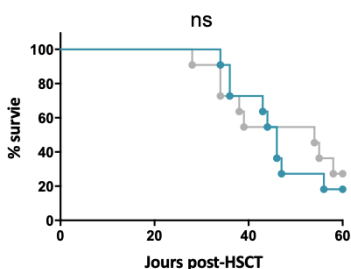


Figure 25. Schéma expérimental pour évaluer l'impact de l'IL-15 dans le cadre de la GVHD sur les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15 avec et sans irradiation.

Lors de l'analyse de la survie, la courbe de survie des souris qui ont été transplantées avec 20 millions de PBMCs ne présente pas de

différence significative entre les souris B-NDG et les souris B-NDG hIL15 (Figure 26A). Concernant la courbe de survie des souris qui ont été irradiées le jour précédent la xénotransplantation et qui ont reçu 2 millions de PBMCs, il n'y a pas de différence significative entre les deux souches de souris non plus (Figure 26B).

A) Courbe de survie des B-NDG vs B-NDG hIL15 sans irradiation



B) Courbe de survie des B-NDG vs B-NDG hIL15 avec irradiation

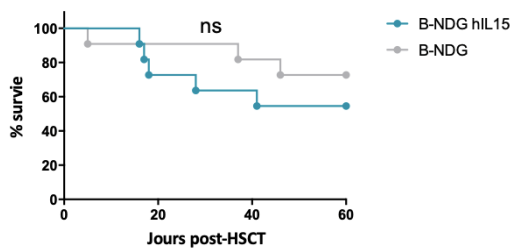


Figure 26. Courbe de survie des B-NDG et B-NDG hIL15 sans irradiation (A) et avec irradiation (B).

Partie 4 – Inhibition de l'expression du gène IL2RA (CD25) sur les lymphocytes T CD8+ par la technique de CRISPR-Cas9

Partie 4 – Inhibition de l'expression du gène IL2RA (CD25) sur les lymphocytes T CD8+ par la technique de CRISPR-Cas9

Ce projet utilise la technologie CRISPR-Cas9 pour réaliser un knock-out du CD25 (gène IL2RA) au sein des lymphocytes T CD8+ afin d'explorer l'impact de l'IL-2 dans la pathogenèse de la GVHD ainsi que sur l'effet GvT.

La technique CRISPR-Cas9 est dérivé d'un mécanisme de défense immunitaire que certaines bactéries utilisent contre les virus. Il a été adapté pour une utilisation en laboratoire permettant de cibler et de modifier spécifiquement des séquences d'ADN à l'intérieur des cellules. L'acronyme CRISPR signifie "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (Répétitions Palindromiques Courtes Groupées et Régulièrement Espacées) et Cas9 fait référence à une protéine associée au système. Ce processus implique la création d'un ARN guide (ARNg) conçu pour correspondre spécifiquement à la séquence génétique que l'on souhaite modifier. Il va donc guider la protéine Cas9 vers la séquence d'ADN spécifique où la Cas9, qui agit comme des ciseaux moléculaires, va induire une coupure double brin. Lorsque la cellule réparera cette coupure, des modifications génétiques peuvent survenir ce qui va permettre, in fine, l'introduction de modifications spécifiques dans le génome.

C'est donc grâce à cette technologie, qu'à termes, notre étude aura pour but d'évaluer les conséquences de l'absence d'expression du CD25 sur les lymphocytes T CD8+ activés au sein d'un modèle de

souris humanisées développant la GVHD. Ces souris seront irradiées la veille de la greffe de PBMCs. Ensuite, les PBMCs humaines qui auront été déplétées en lymphocytes T CD8+ pour effectuer un knock-out au niveau de l'expression de leur CD25 afin de greffer aux souris NSG-HLAA2 des PBMCs déplétées en CD8+ avec des CD8+CD25KO. Ensuite, la prise de greffe, la reconstitution immunitaire et le développement de la pathogenèse de la GVHD seront évalués. Des prises de sang auront lieu aux jours 14, 21 et 28 post-greffe afin de réaliser un immunomarquage pour étudier les différentes sous-populations immunitaires. Les souris seront suivies quotidiennement et scorées 3 fois par semaine selon des critères définis pour caractériser la GVHD tels que la posture, l'anémie, la perte de poids et la perte de mobilité (Figure 27).

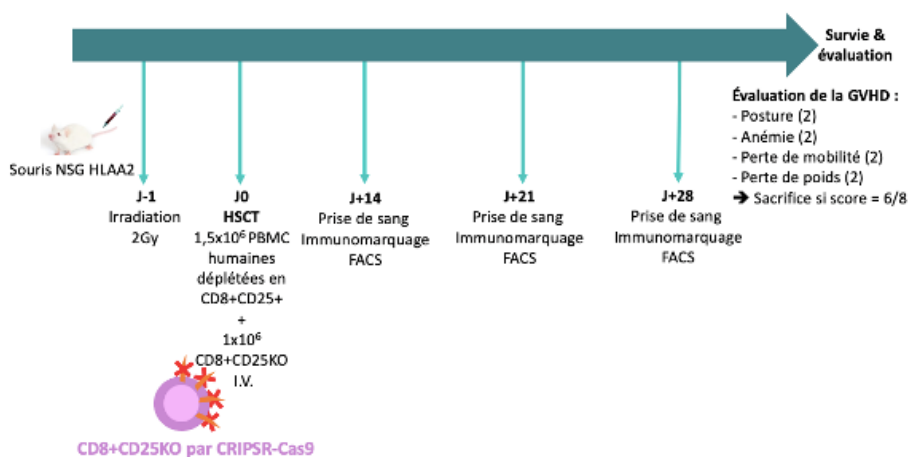


Figure 27. Schéma expérimental pour évaluer l'impact de l'expression du CD25 sur les lymphocytes T CD8+ dans le cadre de la GVHD.

Dans un premier temps, nous avons développé un protocole de transduction pour réaliser un knock-out du CD25. Une transduction consiste à introduire du matériel génétique étranger, tel qu'un gène

ou un fragment d'ADN dans une cellule. Ceci peut être réalisé à l'aide de vecteurs viraux permettant au matériel génétique étranger d'être intégré et exprimé dans le génome de la cellule hôte. Dans notre cas, nous nous sommes intéressées à l'utilisation de lentivirus par la technologie de CRISPR-Cas9. Le but étant d'introduire d'une part l'ARNg ciblant le promoteur du gène IL2RA et d'autre part la Cas9 qui va introduire une cassure double brin au niveau de l'ADN génomique à l'endroit cible ayant pour conséquence de réprimer l'expression du gène grâce à l'utilisation de lentivirus. Ceux-ci peuvent transduire des cellules en division ou non dans le but d'intégrer des transgènes d'intérêt dans leurs cellules cibles, favorisant ainsi l'expression ou la répression génétique à long terme. Les vecteurs lentiviraux possèdent généralement l'enveloppe de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G), mais l'utilisation d'enveloppes alternatives peut également être envisagée afin d'optimiser le taux d'efficacité de transfection comme l'enveloppe des rétrovirus RD114. Nous avons optimisé les paramètres de transduction des lymphocytes T CD8⁺ en utilisant un lentivirus GFP EF1 α env VSVG et un lentivirus mCherry EF1 α env VSVG pour la MOI qui est le rapport entre le nombre de particules lentivirales et le nombre de cellules, l'utilisation d'une molécule facilitant la transduction (polybrène ou protamine sulfate), le milieu de culture et le temps de la centrifugation. Les meilleures conditions ont été les suivantes une MOI égale à 50, l'ajout de polybrène, l'utilisation du milieu X-VIVO et une centrifugation de 30 minutes à 1000 g. Avec ces conditions, nous avons obtenu un taux de lymphocytes T CD8⁺ transduites de 30 à 60% (Figure 28).

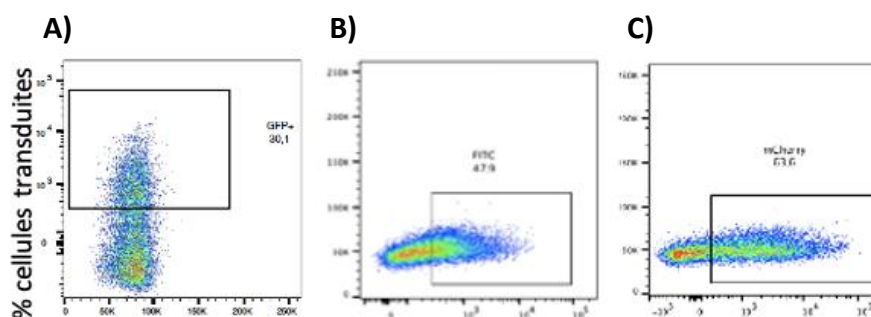


Figure 28. Résultat de lymphocytes T CD8+ transduites avec un lentivirus. A) 30,1% de lymphocytes T CD8+ transduites à l'aide du lentivirus GFP EF1 α env VSVG, B) 47,9% de lymphocytes T CD8+ transduites à l'aide du lentivirus GFP EF1 α env VSVG, C) 63,6% de lymphocytes T CD8+ transduites à l'aide du lentivirus mCherry EF1 α env VSVG.

Nous avons également validé les ARNg ciblant le promoteur du gène IL2RA à l'aide du kit TAKARA « Guide-itTM sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems ». Les ARNg sélectionnés sont disponibles tableau 6.

Tableau 6. Les ARNg sélectionnés pour cibler le promoteur du gène IL2RA.

CD25KO par transduction (lentivirus)

ID	sgRNA	Cible
#1	GCCTCTTTTGGCATCGCGC	Promoteur
#2	GATGGGAAGATCGGTCCGCC	Promoteur
#3	ATCCAGTCTCTATCGGAGTC	Promoteur
#4	CTCACCTACCTCAACGGC	Promoteur
#5	CTCAGGGCTGTAACGTCTC	Promoteur
#6	AGAAGGATGCGGCGAACTGA	Promoteur
#7	TCCGGCGCGATGCCAAAAG	Promoteur
#8	GGCATCGCGCCGGAGGATGT	Promoteur
#9	CGCGCCGGAGGATGTGGGAT	Promoteur
#10	ACCCACAAGGGTGACAGCCC	Promoteur

Les résultats obtenus ont permis de valider les ARNg #1, #2, #3, #5, #6 et #7. Ces ARNg couplés à la Cas9 permettent de conduire la Cas9 à l'endroit cible de l'ADN génomique et d'introduire une coupure à cet endroit spécifique permettant ainsi la répression du gène d'intérêt (Figure 29).

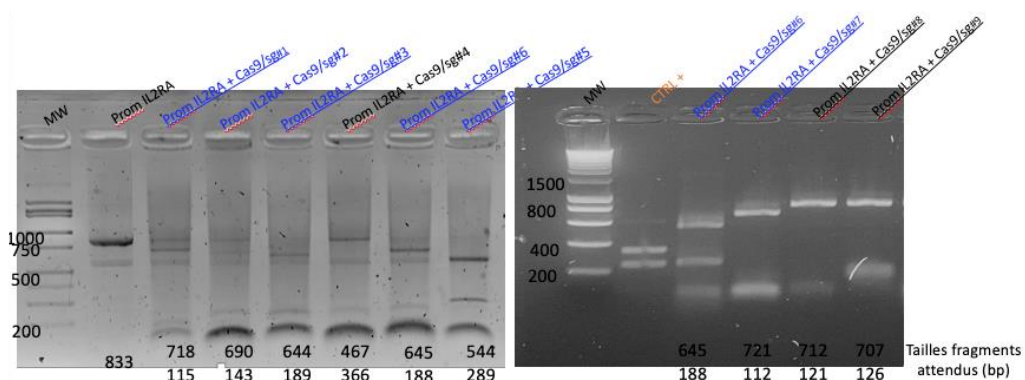


Figure 29. Résultats permettant de valider les ARNg ciblant correctement notre gène d'intérêt à l'aide du kit TAKARA « Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems ».

Nous avons donc utilisé un lentivirus contenant un ARNg validé au préalable et un lentivirus contenant la Cas9. Malheureusement, aucun lymphocyte T CD8+ n'a été transduit. Nous avons émis l'hypothèse que le matériel génétique que nous voulions introduire à l'aide des lentivirus était trop gros que pour permettre la transduction des lymphocytes T CD8+ qui sont, en effet, cellules primaires difficiles à transduire.

Nous avons donc décidé, après de nombreux essais de changer de méthodologie et d'introduire le matériel génétique souhaité par électroporation. Nous parlerons donc ici de transfection qui consiste

à introduire du matériel génétique (comme de l'ADN, de l'ARN ou des protéines) dans des cellules vivantes. L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique pulsé à des cellules, généralement en suspension, pour augmenter temporairement la perméabilité de leur membrane cellulaire et donc la création de pores temporaires. Cela permet l'entrée de molécules telles que de l'ADN, de l'ARN, des protéines ou d'autres composés dans les cellules. Une fois l'impulsion électrique terminée, la membrane cellulaire se referme, et les cellules peuvent reprendre leur fonctionnement normal. Nous avons donc à nouveau optimisé le protocole d'électroporation pour réaliser l'inhibition de l'expression du CD25 sur les lymphocytes T CD8+ et nous avons également validés les ARNg *in vitro*.

Pour ce faire, nous avons sélectionné des ARNg ciblant des séquences codantes du gène IL2RA que vous pourrez voir dans le tableau 7.

Tableau 7. Les ARNg sélectionnés pour cibler les séquences codantes du gène IL2RA.

CD25KO par transfection (électroporation)

ID	sgRNA	Cible
sgRNA Ex1	GGGACTGCTCACGTTTCATCA	Exon1
sgRNA Ex3	TTGTTTCGTTGTGTTCCGAG	Exon3
sgRNA Ex4	CTGCAGGGAACCTCCACCA	Exon4
sgRNA Intr7	TGACTTTGTTACACCACTAC	Intron7

Ensuite, nous avons testé *in vitro* ces ARNg ciblant les séquences codantes du gène IL2RA à l'aide du kit TAKARA « Guide-itTM

sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems ». Les résultats obtenus nous ont permis de valider les ARNg « sgARN Ex1 » et « sgRNA Ex3 ». Effectivement, ces ARNg couplés à la Cas9 permettent de conduire la Cas9 à l'endroit cible de l'ADN génomique et d'introduire une coupure à cet endroit spécifique permettant ainsi la répression du gène d'intérêt (Figure 30).

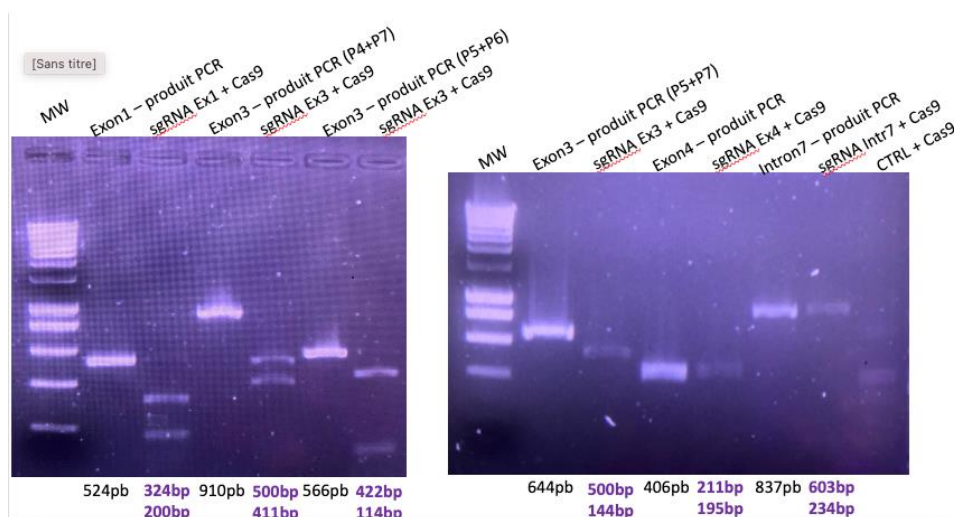


Figure 30. Résultats permettant de valider les ARNg ciblant correctement notre gène d'intérêt à l'aide du kit TAKARA « Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems ».

En parallèle, nous avons optimisé les paramètres d'électroporation à l'aide du « Invitrogen™ Neon™ Transfection System ». Plusieurs conditions d'électroporation ont été testées en analysant principalement deux paramètres à savoir la viabilité cellulaire post-électroporation ainsi que l'efficacité. Concernant la viabilité, nous avons évalué la viabilité des cellules transfectées à l'aide d'un marquage au 7-AAD 24 heures post-électroporation. Et, en ce qui concerne l'efficacité de transfection, nous avons utilisé une molécule GFP fluorescente nommée SiGLO afin d'évaluer le

pourcentage de cellules transfectées par cytométrie en flux 24 heures également post-électroporation. Les résultats concernant les paramètres d'électroporation représentant le meilleur rapport viabilité/efficacité la suivante : 1550V, 10ms, 3 impulsions (Figure 31).

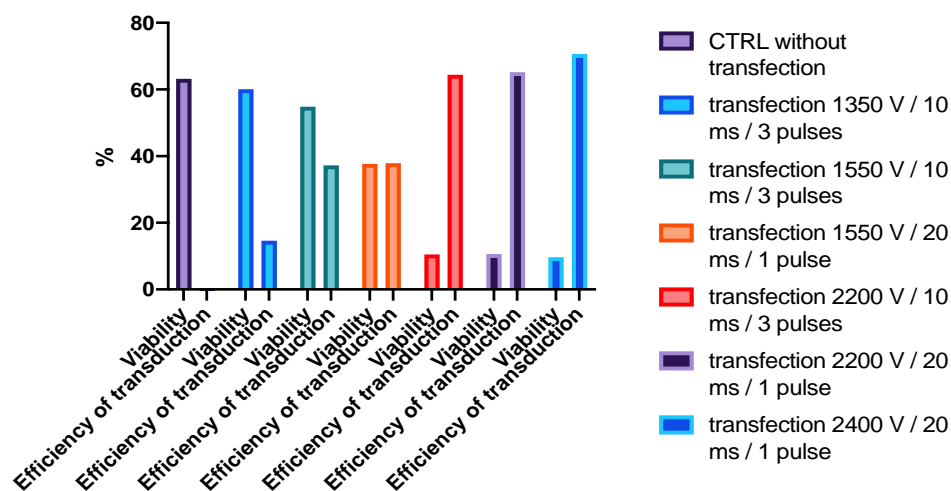


Figure 31. Différentes conditions d'électroporations testées en analysant l'impact sur la viabilité cellulaire en rapport avec l'efficacité de transfection.

Effectivement, nous avons constaté que pour la condition 1550V, 10ms, 3 impulsions, nous avons obtenu une viabilité proche des 60% avec un taux d'efficacité proche des 40%. Cette condition d'électroporation semble donc être le meilleur compromis. En effet, si nous augmentons le voltage, nous pouvons atteindre des taux de cellules transfectées supérieurs à 60% mais nous avons seulement 10% de cellules vivantes ce qui est très faible. Ces conditions ont été confirmées par la répétabilité de ce test.

Dès lors, ce projet pourra être poursuivi pour passer en étude *in vivo* et ainsi utiliser le protocole optimisé pour induire le CD25KO sur le

nombre souhaité de lymphocytes T CD8+ avec un ou les deux ARNg validés ainsi que la Cas9. Ensuite, les cellules CD8CD25KO seront injectées dans les PBMCs appauvris en CD8 pour étudier l'impact de l'IL-2 sur la GVHD et l'effet GvT dans un modèle de souris humanisées.

Bibliographie

Bibliographie

A.G. Chapuis *et al.* (2019) 'T Cell Receptor Gene Therapy Targeting WT1 Prevents Acute Myeloid Leukemia Relapse Post-Transplant', *Nature Medicine*, 25(7), pp. 1064–1072. doi: 10.1038/s41591-019-0472-9.T.

Abboud, R. *et al.* (2020) ' Insights into the role of the JAK/STAT signaling pathway in graft- versus -host disease ', *Therapeutic Advances in Hematology*. SAGE Publications, 11, p. 204062072091448. doi: 10.1177/2040620720914489.

Abeynaïke, S. A. *et al.* (2023) 'Human Hematopoietic Stem Cell Engrafted IL-15 Transgenic NSG Mice Support Robust NK Cell Responses and Sustained HIV-1 Infection', *Viruses*, 15(365).

Abken, H. (2015) 'Review Special Focus Issue: Adoptive cell immunotherapy for cancer', *Immunotherapy*, 7(5), pp. 535–544.

Abu-Ghosh, A. *et al.* (1999) 'Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/cytokines with the incidence of acute graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation', *Bone Marrow Transplantation*, 24(5), pp. 535–544. doi: 10.1038/sj.bmt.1701921.

Akahoshi, Y. *et al.* (2023) 'Incidence, clinical presentation, risk factors, outcomes, and biomarkers in de novo late acute GVHD', *Blood Advances*, 7(16), pp. 4479–4491. doi: 10.1182/bloodadvances.2023009885.

Alpdogan, Ö. *et al.* (2003) 'IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Journal of Clinical Investigation*, 112(7), pp. 1095–1107. doi: 10.1172/JCI200317865.

Apostolova, P. and Zeiser, R. (2016) 'The role of purine metabolites as DAMPs in acute graft-versus-host disease', *Frontiers in Immunology*, 7(OCT), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2016.00439.

Arrighi, N. (2018) *Les cellules souches: Des innovations thérapeutiques sous contrôle*. ISTE editi.

Atilla, E., Atilla, P. A. and Demirer, T. (2017) 'A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations', *Balkan Medical*

Journal. AVES Ibrahim Kara, pp. 1–9. doi: 10.4274/balkanmedj.2017.0055.

Atkinson, K. *et al.* (1990) 'Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation', *Blood*. American Society of Hematology, 75(12), pp. 2459–2464. doi: 10.1182/blood.v75.12.2459.bloodjournal75122459.

Avanzini, M. A. *et al.* (2005) 'B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation: Functional immaturity and slow recovery of memory CD27+ B cells', *Experimental Hematology*, 33(4), pp. 480–486. doi: 10.1016/j.exphem.2005.01.005.

Bailey, C. P. *et al.* (2017) 'New interleukin-15 superagonist (IL-15SA) significantly enhances graft-versus-tumor activity', 8(27), pp. 44366–44378.

Ball, L. M. and Egeler, R. M. (2008) 'Acute GvHD: Pathogenesis and classification', *Bone Marrow Transplantation*, 41(SUPPL. 2), pp. 58–64. doi: 10.1038/bmt.2008.56.

Banerjee, S. *et al.* (2017) 'JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects', *Drugs*. Springer International Publishing, 77(5), pp. 521–546. doi: 10.1007/s40265-017-0701-9.

Barisic, S. and Childs, R. W. (2022) 'Graft-Versus-Solid-Tumor Effect: From Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Adoptive Cell Therapies', *Stem Cells*, 40(6), pp. 556–563. doi: 10.1093/stmcls/sxac021.

Barnes, D. W. *et al.* (1956) 'Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication.', *British medical journal*, 2(4993), pp. 626–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2035298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Barnes, D. W. H. and Loutit, J. F. (1957) 'Treatment of Murine Leukaemia with X-Rays and Homologous Bone Marrow: II', *British Journal of Haematology*, 3, pp. 241–252.

Baron, F. *et al.* (2005) 'Graft-Versus-Tumor Effects After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation With Nonmyeloablative Conditioning', *J Clin Oncol*, 23, pp. 1993–2003. doi: 10.1200/JCO.2005.08.136.

Baron, F. *et al.* (2018) 'Occurrence of graft-versus-host disease

increases mortality after umbilical cord blood transplantation for acute myeloid leukaemia: a report from Eurocord and the ALWP of the EBMT', *Journal of Internal Medicine*, 283(2), pp. 178–189. doi: 10.1111/joim.12696.

Di Benedetto, S. *et al.* (2015) 'Impact of age, sex and CMV-infection on peripheral T cell phenotypes: results from the Berlin BASE-II Study', *Biogerontology*, 16(5), pp. 631–643. doi: 10.1007/s10522-015-9563-2.

Benichou, G. *et al.* (2017) 'Role of memory T cells in allograft rejection and tolerance', *Frontiers in Immunology*, 8(FEB). doi: 10.3389/fimmu.2017.00170.

Best, A. J. *et al.* (2013) 'Transcriptional insights into the CD8+ T cell response to infection and memory T cell formation', *Nature immunology*, 14(4), pp. 404–412. doi: 10.1038/ni.2536.Transcriptional.

Blaser, B. W. *et al.* (2005) 'Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease', *Blood*, 105(2), pp. 894–901. doi: 10.1182/blood-2004-05-1687.

de Bock, M. *et al.* (2013) 'Kinetics of IL-7 and IL-15 Levels after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning', *PLoS ONE*, 8(2), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0055876.

Bolotin, E. *et al.* (1999) 'Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: Relationship to clinical characteristics and lymphocyte count', *Bone Marrow Transplantation*, 23(8), pp. 783–788. doi: 10.1038/sj.bmt.1701655.

Booth, N. J. *et al.* (2010) 'Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4+ Regulatory T Cells That Express either CD45RA or CD45RO', *The Journal of Immunology*, 184(8), pp. 4317–4326. doi: 10.4049/jimmunol.0903781.

Bosch, M., Khan, F. M. and Storek, J. (2012) 'Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation', *Current Opinion in Hematology*, pp. 324–355. doi: 10.1097/MOH.0b013e328353bc7d.

Bosma, G. C., Custer, R. P. and Bosma, M. J. (1983) 'A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse', *Nature* 1983 301:5900. Nature Publishing Group, 301(5900), pp. 527–530. doi: 10.1038/301527a0.

Boyiadzis, M. *et al.* (2008) 'Up-regulation of NK Cell Activating Receptors Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation under a Lymphodepleting Reduced Intensity Regimen is Associated with Elevated IL-15 Levels', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14(3), pp. 290–300. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.12.490.

Van den Brink, M. R. M. and Burakoff, S. J. (2002) 'Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation', *Nature Reviews Immunology*, 2(4), pp. 273–281. doi: 10.1038/nri775.

Cai, J. *et al.* (2019) 'The role of PD-1/PD-L1 axis in treg development and function: Implications for cancer immunotherapy', *OncoTargets and Therapy*, 12, pp. 8437–8445. doi: 10.2147/OTT.S221340.

Cai, M. *et al.* (2023) 'Research progress of interleukin-15 in cancer immunotherapy', *Frontiers in Pharmacology*, 14(May). doi: 10.3389/fphar.2023.1184703.

Canti, L. *et al.* (2021) 'Predictors of neutralizing antibody response to BNT162b2 vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients', *Journal of Hematology and Oncology*, 14(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13045-021-01190-3.

Carniti, C. *et al.* (2015) 'Pharmacologic inhibition of JAK1/JAK2 signaling reduces Experimental murine acute GVHD while preserving GVT effects', *Clinical Cancer Research*, 21(16), pp. 3740–3749. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2758.

Carpenter, A. C. and Bosselut, R. (2010) 'Decision checkpoints in the thymus', *Nature Immunology*, 11(8), pp. 666–673. doi: 10.1038/ni.1887.

Castermans, E. *et al.* (2009) 'Reconstitution du système immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.', *Revue médicale de Liège*, 64 Spec No(1), pp. 2–8.

Castor, M. G. M., Pinho, V. and Teixeira, M. M. (2012) 'The role of chemokines in mediating graft versus host disease: Opportunities for novel therapeutics', *Frontiers in Pharmacology*, 3 FEB(February), pp. 1–13. doi: 10.3389/fphar.2012.00023.

Cauley, L. S. and Lefrançois, L. (2013) 'Guarding the perimeter: Protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells', *Mucosal Immunology*, 6(1), pp. 14–23. doi: 10.1038/mi.2012.96.

Cetkovic-Cvrlje, M. *et al.* (2001) 'Targeting Janus kinase 3 to

attenuate the severity of acute graft-versus-host disease across the major histocompatibility barrier in mice', *Blood*, 98(5), pp. 1607–1613. doi: 10.1182/blood.V98.5.1607.

Chen, D. *et al.* (2021) 'Interleukin-7 Biology and Its Effects on Immune Cells: Mediator of Generation, Differentiation, Survival, and Homeostasis', *Frontiers in Immunology*, 12(December), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2021.747324.

Chik, K. *et al.* (2003) 'Elevated Serum Interleukin-15 Level in Acute Graft-Versus-Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation', *J Pediatr Hematol Oncol*, 25(12), pp. 960–964.

Chinen, T. *et al.* (2016) 'An essential role for the IL-2 receptor in T reg cell function', *Nature Immunology*, 17(11), pp. 1322–1333. doi: 10.1038/ni.3540.

Choi, J. *et al.* (2012) 'IFN γ R signaling mediates alloreactive T-cell trafficking and GVHD', *Blood*, 120(19), pp. 4093–4103. doi: 10.1182/blood-2012-01-403196.

Choi, J. *et al.* (2014) 'Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect', *PLoS ONE*, 9(10), pp. 2–7. doi: 10.1371/journal.pone.0109799.

Choi, J. *et al.* (2018) 'Baricitinib-induced blockade of interferon gamma receptor and interleukin-6 receptor for the prevention and treatment of graft-versus-host disease', *Leukemia* 2018 32:11. Nature Publishing Group, 32(11), pp. 2483–2494. doi: 10.1038/s41375-018-0123-z.

Choi, S. S. *et al.* (2004) 'Interleukin-15 enhances cytotoxicity, receptor expression, and expansion of neonatal natural killer cells in long-term culture', *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(5), pp. 879–888. doi: 10.1128/CDLI.11.5.879-888.2004.

Cohen, J. L. *et al.* (2002) 'CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease', *Journal of Experimental Medicine*, 196(3), pp. 401–406. doi: 10.1084/jem.20020090.

Degos, L. (2009) 'Jean Dausset a scientific pioneer: intuition and creativity for the patients (1916-2009).', *Haematologica*, 94(9), pp. 1331–1332. doi: 10.3324/haematol.2009.014126.

Dekker, L. *et al.* (2020) 'cancers Reconstitution of T Cell Subsets Following Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation'. doi:

10.3390/cancers12071974.

Duffner, U. A. *et al.* (2004) 'Host Dendritic Cells Alone Are Sufficient to Initiate Acute Graft-versus-Host Disease', *The Journal of Immunology*, 172(12), pp. 7393–7398. doi: 10.4049/jimmunol.172.12.7393.

Dulphy, N. *et al.* (2009) 'An Unusual CD56'.

EBMT, A. (2019) *The EBMT Handbook - Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. Springer. Edited by E. Carreras *et al.* doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5>.

Edinger, M. *et al.* (2003) 'CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation', *Nature Medicine*, 9(9), pp. 1144–1150. doi: 10.1038/nm915.

Ehx, G. *et al.* (2018) 'Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease in Humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHD Mice', *Frontiers in Immunology*, 9(August), pp. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2018.01943.

Ehx, G. *et al.* (2021) 'Comprehensive analysis of the immunomodulatory effects of rapamycin on human T cells in graft-versus-host disease prophylaxis', *American Journal of Transplantation*, 21(8), pp. 2662–2674. doi: 10.1111/ajt.16505.

Epstein, R. B. *et al.* (1968) '00007890-196801000-00005.pdf', *Transplantation*, 6(1), pp. 45–58.

Etra, A. *et al.* (2023) 'Effective treatment of low-risk acute GVHD with itacitinib monotherapy', *Blood*. The American Society of Hematology, 141(5), pp. 481–489. doi: 10.1182/blood.2022017442.

Fazilleau, N. *et al.* (2009) 'Follicular Helper T Cells: Lineage and Location', *Immunity*. Elsevier Inc., 30(3), pp. 324–335. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.003.

Ferlazzo, G. and Münz, C. (2004) 'NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 172(3), pp. 1333–1339. doi: 10.4049/jimmunol.172.3.1333.

Ferrara, J. L. M. and M.D.a,* , John E. Levine, M.D.b, Pavan Reddy, M.D.c, and Ernst Holler, M. D. . (2009) 'Graft-versus-Host Disease: Review', *Lancet*, 373(9674), pp. 1550–1561. doi: 10.5935/0034-7280.20190016.

Fowler, D. H. (2019) *Th1/Th2 and Tc1/Tc2 Cells, Immune Biology*

of *Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-812630-1.00012-8.

Fowler, D. H. and Gress, R. E. (2000) 'Th2 and tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: Considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma', *Leukemia and Lymphoma*, 38(3–4), pp. 221–234. doi: 10.3109/10428190009087014.

Von Freeden-Jeffry, U. *et al.* (1995) 'Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine', *Journal of Experimental Medicine*, 181(4), pp. 1519–1526. doi: 10.1084/jem.181.4.1519.

Freeman, G. J. *et al.* (1993) 'Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production', *Journal of Experimental Medicine*, 178(6), pp. 2185–2192. doi: 10.1084/jem.178.6.2185.

Fu, J. *et al.* (2015) 'T-bet Is Critical for the Development of Acute Graft-versus-Host Disease through Controlling T Cell Differentiation and Function', *The Journal of Immunology*, 194(1), pp. 388–397. doi: 10.4049/jimmunol.1401618.

Fu, J., Heinrichs, J. and Yu, X. Z. (2014) 'Helper T-cell differentiation in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(4), pp. 277–301. doi: 10.1007/s00005-014-0284-z.

Gale, R. P. *et al.* (1987) 'Risk factors for acute graft-versus-host disease', *British Journal of Haematology*, 67(4), pp. 397–406. doi: 10.1111/j.1365-2141.1987.tb06160.x.

Gao, C. *et al.* (2021) 'Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 regulates development of xenogenic graft versus host disease in mice via modulation of host immune responses induced by changes in human T cell engraftment and gene expression', *Clinical & Experimental Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 206(3), pp. 422–438. doi: 10.1111/CEI.13659.

Gattinoni, L. *et al.* (2012) 'A human memory T-cell subset with stem cell-like propertiesA analyzed experiments HHS Public Access Author manuscript', *Nat Med*, 17(10), pp. 1290–1297. doi: 10.1038/nm.2446.A.

- Gauthy, E. *et al.* (2013) 'GARP Is Regulated by miRNAs and Controls Latent TGF- β 1 Production by Human Regulatory T Cells', *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0076186.
- Giralt, S. and Bishop, M. R. (2009) 'Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Cancer Treatment and Research*. Springer Netherlands, pp. 1–21. doi: 10.1007/978-0-387-78580-6_1.
- Golubovskaya, V. and Wu, L. (2016) 'Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy', *Cancers*, 8(3). doi: 10.3390/cancers8030036.
- Gooptu, M. and Antin, J. H. (2021) 'GVHD Prophylaxis 2020'. *Front Immunol*, 12. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33897681/> (Accessed: 14 February 2022).
- Gordon, C. L. *et al.* (2017) 'Tissue reservoirs of antiviral T cell immunity in persistent human CMV infection', *Journal of Experimental Medicine*, 214(3), pp. 651–667. doi: 10.1084/jem.20160758.
- Gordy, L. E. *et al.* (2011) 'IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells¹', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(12), pp. 6335–6345. doi: 10.4049/jimmunol.1003965.IL-15.
- Gournay, V. *et al.* (2022) 'Immune landscape after allo-HSCT: TIGIT- and CD161-expressing CD4 T cells are associated with subsequent leukemia relapse', *Blood*, 140(11), pp. 1305–1321. doi: 10.1182/blood.2022015522.
- Gregoire-Gauthier, J. *et al.* (2015) 'Role of natural killer cells in intravenous immunoglobulin-induced graft-versus-host disease inhibition in NOD/LtSz-scidIL2rg^{-/-} (NSG) mice', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc, 21(5), pp. 821–828. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.006.
- Griesemer, A. D., Sorenson, E. C. and Hardy, M. A. (2010) 'The role of the thymus in tolerance', *Transplantation*, 90(5), pp. 465–474. doi: 10.1097/TP.0b013e3181e7e54f.
- Guo, W. W. *et al.* (2021) 'Regulatory T Cells in GVHD Therapy', *Frontiers in Immunology*, 12(June). doi: 10.3389/fimmu.2021.697854.

- Hagel, L. M. *et al.* (2010) 'High IL-15 Serum Levels on Day 7 After Hematopoietic Cell Transplantation Are Associated with a Low Likelihood of Graft-Vs-Host Disease and a High Likelihood of Infections', *Blood*. American Society of Hematology, 116(21), pp. 1271–1271. doi: 10.1182/blood.v116.21.1271.1271.
- Hannon, M. *et al.* (2014) 'Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease', *Transfusion*, 54(2), pp. 353–363. doi: 10.1111/trf.12279.
- Harris, A. C. *et al.* (2016) 'International, multi-center standardization of acute graft-versus-host disease clinical data collection: e raport from the MAGIC consortium', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 22(1), pp. 4–10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001.International.
- Harris, A. C., Ferrara, J. L. M. and Levine, J. E. (2013) 'Access Advances in predicting acute GVHD', 160(3), pp. 288–302. doi: 10.1111/bjh.12142.Advances.
- Harrison, D. A. (2012) 'The JAK / STAT Pathway', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(a011205).
- Hatano, R. *et al.* (2013) 'Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody', *British Journal of Haematology*, 162(2), pp. 263–277.
- Heine, A. *et al.* (2013) 'The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo', *Blood*, 122(7), pp. 1192–1202. doi: 10.1182/blood-2013-03-484642.
- Hill, G. R. and Koyama, M. (2020) 'Cytokines and costimulation in acute graft-versus-host disease', *Blood*, 136(4), pp. 418–428. doi: 10.1182/blood.2019000952.
- Ho, V. T. and Soiffer, R. J. (2001) 'The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Blood*, 98(12), pp. 3192–3204. doi: 10.1182/blood.V98.12.3192.
- Holler, E. *et al.* (2004) 'Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation', *Blood*, 104(3), pp. 889–894. doi: 10.1182/blood-2003-10-3543.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003) 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3', *Science*, 299,

pp. 1057–1061. doi: 10.1126/science.1079490.

Horowitz, M. M. *et al.* (1990) 'Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation', *Blood*, 75(3), pp. 555–562. doi: 10.1182/blood.v75.3.555.bloodjournal753555.

Hu, X. *et al.* (2021) 'The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic', *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer US, 6(1). doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.

Hua, J. *et al.* (2015) 'Diverse Gene Expression in Human Regulatory T Cell Subsets Uncovers Connection between Regulatory T Cell Genes and Suppressive Function', *The Journal of Immunology*, 195(8), pp. 3642–3653. doi: 10.4049/jimmunol.1500349.

Huarte, E., Peel, M., Juvekar, A., Dubé, P., *et al.* (2021) 'Ruxolitinib, a JAK1/JAK2 selective inhibitor, ameliorates acute and chronic steroid-refractory GvHD mouse models', *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd., 13(12), pp. 977–987. doi: 10.2217/IMT-2021-0013/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE5.JPEG.

Huarte, E., Peel, M., Juvekar, A., Dub, P., *et al.* (2021) 'Ruxolitinib, a JAK1/JAK2 selective inhibitor, ameliorates acute and chronic steroid-refractory GvHD mouse models', 13, pp. 977–987.

Di Ianni, M. *et al.* (2011) 'Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation', *Blood*, 117(14), pp. 3921–3928. doi: 10.1182/blood-2010-10-311894.

Ishikawa, F. *et al.* (2005) 'Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice', *Blood*. American Society of Hematology, 106(5), pp. 1565–1573. doi: 10.1182/BLOOD-2005-02-0516.

Ito, M. *et al.* (2002) 'NOD/SCID/ γ cnnull mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells', *Blood*. American Society of Hematology, 100(9), pp. 3175–3182. doi: 10.1182/blood-2001-12-0207.

Ivanov, I. I. *et al.* (2006) 'The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells', *Cell*, 126(6), pp. 1121–1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035.

Jachimowicz, L. and Guenther, G. (2019) 'Analyse complète de l'état des lymphocytes T après activation avec un panel d'immunophénotypage à 16 couleurs sur le cytomètre en flux

NovoCyte Advanteon', *Agilent Technologies*.

Jackson, S. W. *et al.* (2016) 'B cell IFN- γ receptor signaling promotes autoimmune germinal centers via cell-intrinsic induction of BCL-6', *Journal of Experimental Medicine*, 213(5), pp. 733–750. doi: 10.1084/jem.20151724.

El Jammal, T. *et al.* (2019) 'Les inhibiteurs de JAK : perspectives pour la médecine interne', *La Revue de Médecine Interne*, 40(12), pp. 816–825. doi: 10.1016/j.revmed.2019.07.016.

Jiang, H. *et al.* (2021) 'T Cell Subsets in Graft Versus Host Disease and Graft Versus Tumor', *Frontiers in Immunology*, 12(October), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2021.761448.

Jin, K. T. *et al.* (2021) 'Development of humanized mouse with patient-derived xenografts for cancer immunotherapy studies: A comprehensive review', *Cancer Science*, 112(7), pp. 2592–2606. doi: 10.1111/cas.14934.

Joseph Pidala, Shernan G. Holtan, Kelly Walton, Jongphil Kim, Hany Elmariah, Asmita Mishra, Nelli Bejanyan, Taiga Nishihori, Farhad Khimani, Lia Perez, Rawan Faramand, Marco Davila, Claudio Anasetti, Daniel Weisdorf, Bruce R Blazar, Jeffrey S Miller, Vero, B. C. B. (2023) 'JAK2/mTOR Inhibition Fails to Prevent Acute Gvhd Despite Reduced Th1/Th17 Cells: Final Phase II Trial Results', *Blood*, 142(1), p. 2177.

Kambayashi, T. and Laufer, T. M. (2014) 'Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: Can anything replace a dendritic cell?', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(11), pp. 719–730. doi: 10.1038/nri3754.

Khandelwal, P. *et al.* (2017) 'Ruxolitinib as Salvage Therapy in Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Patients', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc., 23(7), pp. 1122–1127. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.03.029.

Kim, S. *et al.* (2022) 'Baricitinib prevents GvHD by increasing Tregs via JAK3 and treats established GvHD by promoting intestinal tissue repair via EGFR', *Leukemia*, 36(1), pp. 292–295. doi: 10.1038/s41375-021-01360-9.

King, M. *et al.* (2008) 'A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted

- mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene', *Clinical Immunology*, 126(3), pp. 303–314. doi: 10.1016/j.clim.2007.11.001.
- King, M. A. *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', *Clinical and Experimental Immunology*, 157(1), pp. 104–118. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x.
- Koestenbauer, S. *et al.* (2009) 'Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood', *Cell Transplantation*, pp. 1059–1068. doi: 10.3727/096368909X471288.
- Kolb, H.-J. *et al.* (2004) 'Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras'. doi: 10.1182/blood-2003-02-0342.
- Koyama, M. and Hill, G. R. (2021) 'Mouse Models of Antigen Presentation in Hematopoietic Stem Cell Transplantation', *Frontiers in Immunology*, 12(September), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2021.715893.
- Kumar, A. J. *et al.* (2018) 'Graft-versus-host disease in recipients of male unrelated donor compared with parous female sibling donor transplants', *Blood Advances*, 2(9), pp. 1022–1031. doi: 10.1182/bloodadvances.2017013052.
- De La Rochere, P. *et al.* (2018) 'Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology', *Trends in Immunology*. Elsevier, 39(9), pp. 748–763. doi: 10.1016/J.IT.2018.07.001.
- Lee, J. Y., Han, A.-R. and Lee, D. R. (2019) 'T Lymphocyte Development and Activation in Humanized Mouse Model', *Development & Reproduction*, 23(2), pp. 79–92. doi: 10.12717/dr.2019.23.2.079.
- Leonard, W. J., Lin, J. X. and O'Shea, J. J. (2019) 'The γ c Family of Cytokines: Basic Biology to Therapeutic Ramifications', *Immunity*. Elsevier Inc., 50(4), pp. 832–850. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.028.
- Van Lint, M. T. *et al.* (2006) 'Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: Significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin', *Blood*, 107(10), pp. 4177–4181. doi: 10.1182/blood-2005-12-4851.

Lipp, M. *et al.* (1999) 'LU Two subsets of memory T lymphocytes Sallusto 1999', pp. 34–38.

Little, M. T. and Storb, R. (2002) 'History of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation', *nature review cancer*, 2(March), pp. 231–237. doi: 10.1016/B978-0-12-407179-7.00024-2.

Lodolce, J. P. *et al.* (1998) 'IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation', *Immunity*, 9(5), pp. 669–676. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80664-0.

Ma, S., Caligiuri, M. A. and Yu, J. (2022) 'Harnessing IL-15 signaling to potentiate NK cell-mediated cancer immunotherapy', *Trends in Immunology*, 43(10), pp. 833–847. doi: 10.1016/j.it.2022.08.004.

Van Der Maas, N. G. *et al.* (2019) 'B cell reconstitution and influencing factors after hematopoietic stem cell transplantation in children', *Frontiers in Immunology*, 10(APR), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2019.00782.

MacMillan, M. L. *et al.* (2015) 'A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc, 21(4), pp. 761–767. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.01.001.

Madhusudhanan Sukumar *et al.* (2016) 'Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy', *cell metab*, 23(1), pp. 63–76. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.002.

Mahuzier, B. *et al.* (2020) 'Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease', pp. 1–11. doi: 10.1056/NEJMoa1917635.

Maldonado, M. S. *et al.* (2017) 'Compassionate use of ruxolitinib in acute and chronic graft versus host disease refractory both to corticosteroids and extracorporeal photopheresis', *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central, 6(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s40164-017-0092-3.

Mark A. Schroeder, Jaebok Choi, Himachandana Atluri, Jordan Atkins, Melinda Harding, Jeremy Eisele, Feng Gao, Ramzi Abboud, Camille Abboud, Sr., Amanda F. Cashen, Matthew Christopher, Todd A. Fehniger, Francesca Ferraro, Armin Ghobadi, Meagan A. Jacoby, I, J. F. D. (2022) 'Phase I Study of Baricitinib Gvhd

Prophylaxis in HLA-Matched, Peripheral Blood Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant', *Blood*, 140(1), pp. 1875–1876. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2022-157214>.

Mark A. Schroeder, MD, Jaebok Choi, PhD, Karl Staser, MD, PhD, and John F. DiPersio, MD, P. (2018) 'The Role of Janus Kinase Signaling in Graft-Versus-Host Disease and Graft Versus Leukemia Mark', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(6), pp. 1125–1134. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Martin, M. D. and Badovinac, V. P. (2018) 'Defining memory CD8 T cell', *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.02692.

Martini, D. J., Chen, Y. Bin and DeFilipp, Z. (2022) 'Recent FDA Approvals in the Treatment of Graft-Versus-Host Disease', *Oncologist*, 27(8), pp. 685–693. doi: 10.1093/oncolo/oyac076.

Massart J., B. C. (1891) 'LE CHIMIOTAXISME DES LEUCOCYTES L'INFECTION MICROBIENNE', *Annales de l' Institut Pasteur*, 5(7), pp. 417–444.

Mathew, N. R. et. al. (2018) 'Sorafenib promotes graft-versus-leukemia activity in mice and humans through IL-15 production in FLT3-ITD mutant leukemia cells', *Nat Med*, 24(3), pp. 282–291. doi: 10.1038/nm.4484.Sorafenib.

Mazzucchelli, R. and Durum, S. K. (2007) 'Interleukin-7 receptor expression: Intelligent design', *Nature Reviews Immunology*, 7(2), pp. 144–154. doi: 10.1038/nri2023.

McLarnon, A. et al. (2010) 'CD8+ T-cell immunity against cancer-testis antigens develops following allogeneic stem cell transplantation and reveals a potential mechanism for the graft-versus-leukemia effect', *Haematologica*, 95(9), pp. 1572–1578. doi: 10.3324/haematol.2009.019539.

Metschnikoff, E. (1884) 'Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger', *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, 96(2), pp. 177–195. doi: 10.1007/BF02361555.

Miron, M. et al. (2021) 'Maintenance of the human memory T cell repertoire by subset and tissue site', *Genome Medicine*. *Genome Medicine*, 13(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13073-021-00918-7.

- Miyara, M. *et al.* (2009) 'Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor', *Immunity*, 30(6), pp. 899–911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.
- Mosier, D. (1988) 'Transfer of functional human immune system to mice', pp. 256–259.
- Mueller, S. N. and Mackay, L. K. (2016) 'Tissue-resident memory T cells: Local specialists in immune defence', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(2), pp. 79–89. doi: 10.1038/nri.2015.3.
- Murray, John *et al.* (2018) 'Graft-Versus-Host Disease (GvHD)', *The European Blood and Marrow Transplantation*. doi: 10.1007/978-3-319-50026-3_11.
- Nassereddine, S. *et al.* (2017) 'Acute graft versus host disease: A comprehensive review', *Anticancer Research*, 37(4), pp. 1547–1555. doi: 10.21873/anticancer.11483.
- Nelli Bejanyan *et al.* (2016) 'Sirolimus and Mycophenolate Mofetil as Calcineurin Inhibitor- Free GVHD Prophylaxis for RIC Umbilical Cord Blood Transplantation', *blood marrow transplantation*, 22(11), pp. 2025–2030. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.08.005.Sirolimus.
- Niederwieser, D. *et al.* (2022) 'One and a half million hematopoietic stem cell transplants: continuous and differential improvement in worldwide access with the use of non-identical family donors', *Haematologica*, 107(5), pp. 1045–1053. doi: 10.3324/haematol.2021.279189.
- Oettinger, M. A. *et al.* (1990) 'RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination', *Science*, 248, pp. 1517–1523.
- Ogonek, J. *et al.* (2016) 'Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Frontiers in Immunology*, 7(NOV), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507.
- Okiyama, N. *et al.* (2014) 'Reversal of CD8 T-cell-mediated mucocutaneous graft-versus-host-like disease by the JAK inhibitor tofacitinib', *Journal of Investigative Dermatology*, 134(4), pp. 992–1000. doi: 10.1038/jid.2013.476.
- Oparaugo, N. C. *et al.* (2023) 'Human Regulatory T Cells: Understanding the Role of Tregs in Select Autoimmune Skin

Diseases and Post-Transplant Nonmelanoma Skin Cancers', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). doi: 10.3390/ijms24021527.

Owen, D. L. *et al.* (2018) 'Identification of Cellular Sources of IL-2 Needed for Regulatory T Cell Development and Homeostasis', *The Journal of Immunology*, 200(12), pp. 3926–3933. doi: 10.4049/jimmunol.1800097.

Pascolo, B. S. *et al.* (1997) 'HLA-A2.1–restricted Education and Cytolytic Activity of CD8', *The rockefeller university press*, 185(12), pp. 2043–2051.

Paul J. Martin¹, J. Douglas Rizzo², John R. Wingard³, Karen Ballen⁴, Peter T. Curtin⁵, Corey Cutler⁶, Mark R. Litzow⁷, Yago Nieto⁸, Bipin N. Savani⁹, Jeffrey R. Schriber¹⁰, Paul J. Shaughnessy¹¹, Donna A. Wall¹², and P. A. C. 1Fred (2012) 'First and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft- versus-host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18(8), pp. 1150–1163. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Pearce, E. *et al.* (2013) 'Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function', *Science*, 342(6155), p. 1242454. doi: 10.1126/science.1242454.

Perera, P. Y. *et al.* (2012) 'The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: Implications for its therapeutic use', *Microbes and Infection*, 14(3), pp. 247–261. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.006.

Pidala, J. *et al.* (2021) 'Pacritinib combined with sirolimus and low-dose tacrolimus for GVHD prevention after allogeneic hematopoietic cell transplantation: Preclinical and phase I trial results', *Clinical Cancer Research*, 27(10), pp. 2712–2722. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4725.

Puchalapalli, M. *et al.* (2016) 'NSG mice provide a better spontaneous model of breast cancer metastasis than athymic (nude) mice', *PLoS ONE*, 11(9), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0163521.

Raitman, I. *et al.* (2021) 'Human Placental CD34 + -Derived Natural Killer Cells with High Affinity and Cleavage Resistant CD16 (CYNK-101) in Combination with Daratumumab for Immunotherapy Against CD38 Expressing Hematological Malignancies', *Blood*,

138(Supplement 1), pp. 2773–2773. doi: 10.1182/blood-2021-148869.

Rajesha, D. *et al.* (2010) 'Th1 and Th17 Immunocompetence in Humanized NOD/SCID/ γ C- KO mice', *Hum Immunol*, 71(6), pp. 551–559. doi: 10.1016/j.humimm.2010.02.019.Th1.

Ramadan, A. and Paczesny, S. (2015) 'Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation', *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), pp. 1–20. doi: 10.3389/fimmu.2015.00014.

Rawlings, J. S., Rosler, K. M. and Harrison, D. A. (2004) 'The JAK/STAT signaling pathway', *Journal of Cell Science*, 117(8), pp. 1281–1283. doi: 10.1242/jcs.00963.

Resnick, I. B., Shapira, M. Y. and Slavin, S. (2005) 'Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases', in *Transplant Immunology*, pp. 207–219. doi: 10.1016/j.trim.2005.03.009.

Ringdén, O. (2007) 'Immunotherapy by Allogeneic Stem Cell Transplantation', *Advances in Cancer Research*, 97(06), pp. 25–60. doi: 10.1016/S0065-230X(06)97002-X.

Ritacco, C. *et al.* (2021) 'High proportion of terminally differentiated regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation', *Bone Marrow Transplantation*. Springer US, 56(8), pp. 1828–1841. doi: 10.1038/s41409-021-01221-0.

Ritacco, C. *et al.* (2023) 'Post-transplant cyclophosphamide prevents xenogeneic graft-versus-host disease while depleting proliferating regulatory T cells', *iScience*, 26(3), p. 106085.

Rosenblum, M. D., Sing Way, S. and Abbas, A. K. (2016) 'Regulatory T cell memory', *Nature Reviews Immunology*, 16(2), pp. 90–101. doi: 10.1038/nri.2015.1.

Rovatti, P. E. *et al.* (2020) 'Mechanisms of Leukemia Immune Evasion and Their Role in Relapse After Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation', *Frontiers in Immunology*, 11(February), pp. 1–17. doi: 10.3389/fimmu.2020.00147.

Roychowdhury, S. *et al.* (2005) 'IL-15 but not IL-2 rapidly induces lethal xenogeneic graft-versus-host disease', *Blood*, 106(7), pp. 2433–2435.

Ruggeri, L. *et al.* (2002) 'science', *Science*, 295.

Ruggeri, L. *et al.* (2007) 'Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: Challenging its predictive value', *Blood*, 110(1), pp. 433–440. doi: 10.1182/blood-2006-07-038687.

Ryan D. Michalek *et al.* (2011) 'Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4⁺ T Cell Subsets', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(6), pp. 3299–3303. doi: 10.4049/jimmunol.1003613.Cutting.

Saikh, K. U. *et al.* (2001) 'IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells', *Clinical and Experimental Immunology*, 126(3), pp. 447–455. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01672.x.

Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010) 'The regulation of IL-10 production by immune cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(3), pp. 170–181. doi: 10.1038/nri2711.

Sauter, C. *et al.* (2012) 'Interleukin-15 (IL-15) Administration Increases Graft Versus Leukemia Activity in Recipients of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Ltd, 18(2), p. S358. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.12.410.

Schenkel, J. M. and David Masopust (2014) 'Tissue-Resident Memory T Cells Jason', *Immunity*, 41(6), pp. 886–897. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.007.

Schiavon, V. *et al.* (2019) 'Microenvironment tailors nTreg structure and function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), pp. 6298–6307. doi: 10.1073/pnas.1812471116.

Schmidt, A., Oberle, N. and Krammer, P. H. (2012) 'Molecular mechanisms of treg-mediated cell suppression', *Frontiers in Immunology*, 3(MAR), pp. 1–20. doi: 10.3389/fimmu.2012.00051.

Schroeder, M. A. *et al.* (2018) 'The Role of Janus Kinase Signaling in Graft-Versus-Host Disease and Graft Versus Leukemia', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc., 24(6), pp. 1125–1134. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.12.797.

Schroeder, M. A. and DiPersio, J. F. (2011) 'Mouse models of graft-versus-host disease: Advances and limitations', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 4(3), pp. 318–333. doi:

10.1242/dmm.006668.

Secombes, C. J., Wang, T. and Bird, S. (2016) *Vertebrate Cytokines and Their Evolution, The Evolution of the Immune System: Conservation and Diversification*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-801975-7.00005-0.

Seddiki, N. *et al.* (2006) 'Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life', *Blood*, 107(7), pp. 2830–2838. doi: 10.1182/blood-2005-06-2403.

Shlomchik, W. D. *et al.* (1999) 'Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen- presenting cells', *Science*, 285(5426), pp. 412–415. doi: 10.1126/science.285.5426.412.

Shultz, L. D. *et al.* (2010) 'Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2rynull humanized mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 107(29), pp. 13022–13027. doi: 10.1073/PNAS.1000475107/-/DCSUPPLEMENTAL.

Shultz, L. D., Ishikawa, F. and Greiner, D. L. (2007) 'Humanized mice in translational biomedical research', *Nature Reviews Immunology* 2007 7:2. Nature Publishing Group, 7(2), pp. 118–130. doi: 10.1038/nri2017.

Silverstein, A. M. (1979) 'Cellular versus humoral immunity: Determinants and consequences of an epic 19th century battle', *Cellular Immunology*, 48(1), pp. 208–221. doi: 10.1016/0008-8749(79)90113-8.

Sindaco, P. *et al.* (2023) 'The role of interleukin-15 in the development and treatment of hematological malignancies', *Frontiers in Immunology*, 14(April), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2023.1141208.

Socié, G. *et al.* (2021) 'Insights from integrating clinical and preclinical studies advance understanding of graft-versus-host disease', *Journal of Clinical Investigation*, 131(12). doi: 10.1172/JCI149296.

Socié, G. and Blazar, B. R. (2009) 'Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside', *Blood*. American Society of Hematology, 114(20), pp. 4327–4336. doi: 10.1182/BLOOD-2009-06-204669.

Solimando, A. G., Desantis, V. and Ribatti, D. (2022) 'Mast Cells and Interleukins', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms232214004.

Søndergaard, H., Kvist, P. H. and Haase, C. (2012) 'Human T cells depend on functional calcineurin, tumour necrosis factor- α and CD80/CD86 for expansion and activation in mice'. doi: 10.1111/cei.12051.

Spoerl, S. *et al.* (2014) 'Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease', *Blood*, 123(24), pp. 3832–3842. doi: 10.1182/blood-2013-12-543736.

Stadler, M. *et al.* (2023) 'The graft-versus-leukemia effect of prophylactic donor lymphocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation is equally effective in relapse prevention but safer compared to spontaneous graft-versus-host disease', *Annals of Hematology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 102(9), pp. 2529–2542. doi: 10.1007/s00277-023-05276-5.

Storb, R. *et al.* (1968) '00007890-196807000-00011.Pdf', *Transplantation*, pp. 587–593.

Storb, R. (2012) 'Edward Donnall Thomas', *Nature*, 491, p. 334. doi: 10.1016/s0140-6736(12)62146-1.

Storek, J. (2008) 'Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - Its relation to the contents of the graft', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(5), pp. 583–597. doi: 10.1517/14712598.8.5.583.

Sugimoto, N. *et al.* (2003) 'Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN- γ production induced by IL-12 alone or together with IL-18', *European Journal of Immunology*, 33(1), pp. 243–251. doi: 10.1002/immu.200390027.

Tang, D. *et al.* (2012) 'PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity', *Immunological reviews*, 249, pp. 158–175. Available at: [papers://1825b63a-f617-4840-9a49-fa78b8732348/Paper/p1178](https://doi.org/10.1002/immu.200390027).

Tary-Lehmann, M., Saxon, A. and Lehmann, P. V. (1995) 'The human immune system in hu-PBL-SCID mice', *Immunology Today*, 16(11), pp. 529–533. doi: 10.1016/0167-5699(95)80046-8.

Tecchio, C. and Cassatella, M. A. (2021) 'Uncovering the multifaceted roles played by neutrophils in allogeneic hematopoietic

stem cell transplantation', *Cellular and Molecular Immunology*. Springer Nature, pp. 905–918. doi: 10.1038/s41423-020-00581-9.

Thiant, S. *et al.* (2010) 'Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse', *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group, 45(10), pp. 1546–1552. doi: 10.1038/bmt.2010.13.

Thome, J. J. C. *et al.* (2014) 'Spatial map of human t cell compartmentalization and maintenance over decades of life', *Cell*. Elsevier Inc., 159(4), pp. 814–828. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.026.

Tian, Y. *et al.* (2017) 'Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01728-5.

Torphy, R. J., Schulick, R. D. and Zhu, Y. (2017) 'Newly emerging immune checkpoints: Promises for future cancer therapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), pp. 1–13. doi: 10.3390/ijms18122642.

Toubai, T. *et al.* (2016) 'Danger signals and graft-versus-host disease: Current understanding and future perspectives', *Frontiers in Immunology*, 7(NOV), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2016.00539.

Toubert, A. *et al.* (2012) 'Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: Never say never again', *Tissue Antigens*, 79(2), pp. 83–89. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01820.x.

Traggiai, E. *et al.* (2004) 'Development of a Human Adaptive Immune System in Cord Blood Cell-Transplanted Mice', *Science*, 304(5667), pp. 104–107. doi: 10.1126/science.1093933.

Vago, L. *et al.* (2009) 'Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation', *New England Journal of Medicine*, 361(5), pp. 478–488. doi: 10.1056/nejmoa0811036.

Végran, F. *et al.* (2014) 'The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of T H9 cells', *Nature Immunology*, 15(8), pp. 758–766. doi: 10.1038/ni.2925.

Velardi, A., Ruggeri, L. and Mancusi, A. (2012) 'Killer-cell immunoglobulin-like receptors reactivity and outcome of stem cell transplant', *Current Opinion in Hematology*, 19(4), pp. 319–323. doi:

10.1097/MOH.0b013e32835423c3.

Velardi, E., Tsai, J. J. and van den Brink, M. R. M. (2021) 'T cell regeneration after immunological injury', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 21(5), pp. 277–291. doi: 10.1038/s41577-020-00457-z.

Waldmann, T. A. (2006) 'The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design', *Nature Reviews Immunology*, 6(8), pp. 595–601. doi: 10.1038/nri1901.

Watanabe, N. *et al.* (2005) 'Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus', *Nature*, 436(7054), pp. 1181–1185. doi: 10.1038/nature03886.

Watanabe, N. *et al.* (2011) 'Kinetics of pDCs, mDCs, $\gamma\delta$ T cells and regulatory T cells in association with graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation', *International Journal of Laboratory Hematology*, 33(4), pp. 378–390. doi: 10.1111/J.1751-553X.2011.01300.X.

Wei-ping, Z. and Flavell, R. A. (1997) 'The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells', *Cell*, 89, pp. 587–596. doi: 10.1016/s0030-6657(08)70226-9.

Weiden, P. L. *et al.* (1979) 'antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts', *New England Journal of Medicine*, 300(19), pp. 1068–1073.

Weiskopf, D. *et al.* (2015) 'Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1⁺ cytotoxic CD4⁺ T cells associated with protective immunity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), pp. E4256–E4263. doi: 10.1073/pnas.1505956112.

Wong, E. *et al.* (2019) 'Strategies to enhance the graft versus tumour effect after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation', *Bone Marrow Transplantation*. Springer US, 54(2), pp. 175–189. doi: 10.1038/s41409-018-0244-z.

Wu, X. *et al.* (2018) 'CD8⁺Resident memory T cells and viral infection', *Frontiers in Immunology*, 9(SEP). doi: 10.3389/fimmu.2018.02093.

Wu, Y., Anasetti, C. and Yu, X.-Z. (2019) *T-Cell Costimulation and Coinhibition in Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-*

Leukemia Effect, Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-812630-1.00011-6.

Wu, Y. and Yu, X. Z. (2018) 'IL-17A % Th17 in GvHD', *Cellular and Molecular Immunology*, 15(3), pp. 282–283. doi: 10.1038/cmi.2016.54.

Wysocki, C. A. *et al.* (2005) 'Leukocyte migration and graft-versus-host disease', *Blood*, 105(11), pp. 4191–4199. doi: 10.1182/blood-2004-12-4726.

Zeiser, R. *et al.* (2007) 'Preemptive HMG-CoA reductase inhibition provides graft-versus-host disease protection by Th-2 polarization while sparing graft-versus-leukemia activity', *Blood*, 110(13), pp. 4588–4598. doi: 10.1182/blood-2007-08-106005.

Zeiser, R. *et al.* (2015) 'Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: A multicenter survey', *Leukemia*, 29(10), pp. 2062–2068. doi: 10.1038/leu.2015.212.

Zeiser, R. (2019) 'Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease', *British Journal of Haematology*, 187(5), pp. 563–572. doi: 10.1111/bjh.16190.

Zeiser, R. *et al.* (2020) 'Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease', *New England Journal of Medicine*, 382(19), pp. 1800–1810. doi: 10.1056/nejmoa1917635.

Zeiser, R. *et al.* (2022) 'Efficacy and safety of itacitinib versus placebo in combination with corticosteroids for initial treatment of acute graft-versus-host disease (GRAVITAS-301): a randomised, multicentre, double-blind, phase 3 trial', *The Lancet. Haematology*. *Lancet Haematol*, 9(1), pp. e14–e25. doi: 10.1016/S2352-3026(21)00367-7.

Zhang, Z. *et al.* (2012) 'Insights on Foxn1 biological significance and usages of the "nude" mouse in studies of T-Lymphopoiesis', *International Journal of Biological Sciences*, 8(8), pp. 1156–1167. doi: 10.7150/ijbs.5033.

Zhou, Y. *et al.* (2022) 'Interleukin 15 in Cell-Based Cancer Immunotherapy', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7311).

Ziegler, S. F. and Liu, Y. J. (2006) 'Thymic stromal lymphopoietin in

normal and pathogenic T cell development and function', *Nature Immunology*, 7(7), pp. 709–714. doi: 10.1038/ni1360.

Annexes

Annexes

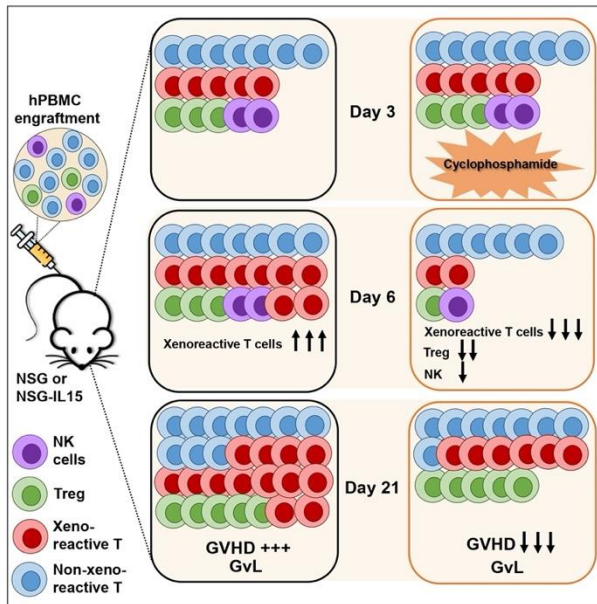
Co-author :

C. Ritacco, M. C. Köse, J. Courtois, L. Canti, C. Beguin, S. DUBOIS, B. Vandenhove et al. "Post-transplant cyclophosphamide prevents xenogeneic graft-versus-host disease while depleting proliferating regulatory T cells." *iScience*, 26, no. 3 (17 March 2023): 106085. doi:10.1016/j.isci.2023.106085
<https://hdl.handle.net/2268/300893>

N. Noronha, C. Durette, M. Cahuzac, B. E Silva, J. Courtois, J. Humeau, A. Sauvat, M.-P. Hardy et al. (2024) "Autophagy degrades immunogenic endogenous retroelements induced by 5-azacytidine in acute myeloid leukemia", *Leukemia*. Springer US, (December 2022), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41375-024-02250-6.

Article

Post-transplant cyclophosphamide prevents xenogeneic graft-versus-host disease while depleting proliferating regulatory T cells



Caroline Ritacco,
Murat Cem Köse,
Justine Courtois,
..., Yves Beguin,
Grégory Ehx,
Frédéric Baron

g.ehx@uliege.be (G.E.)
f.baron@uliege.be (F.B.)

Highlights

Post-transplant cyclophosphamide prevents GVHD by depleting alloreactive T-cells

Post-transplant cyclophosphamide depletes proliferative regulatory T cells

Post-transplant cyclophosphamide does not abrogate graft-versus-leukemia effects

Ritacco et al., iScience 26, 106085
March 17, 2023 © 2023 The Authors.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106085>



Article

Post-transplant cyclophosphamide prevents xenogeneic graft-versus-host disease while depleting proliferating regulatory T cells

Caroline Ritacco,¹ Murat Cem Köse,¹ Justine Courtois,¹ Lorenzo Canti,¹ Charline Beguin,¹ Sophie Dubois,¹ Benoît Vandenhove,¹ Sophie Servais,^{1,2} Jo Caers,^{1,2} Yves Beguin,^{1,2} Grégory Ehx,^{1,3,*} and Frédéric Baron^{1,2,3,4,*}

SUMMARY

Graft-versus-host disease (GVHD) remains a serious limitation of allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). While post-transplant administration of cyclophosphamide (PTCy) is increasingly used as GVHD prophylaxis, its precise mechanisms of action and its impact on graft-versus-leukemia effects have remained debated. Here, we studied the mechanisms of xenogeneic GVHD (xGVHD) prevention by PTCy in different humanized mouse models. We observed that PTCy attenuated xGVHD. Using flow cytometry and single-cell RNA-sequencing, we demonstrated that PTCy depleted proliferative CD8⁺ and conventional CD4⁺ T cells but also proliferative regulatory T cells (Treg). Further, T-cell receptor β variable region sequencing (TCRVB) analyses demonstrated that highly xenoreactive T-cell clones were depleted by PTCy. Although Treg frequencies were significantly higher in PTCy-treated than in control mice on day 21, xGVHD attenuation by PTCy was not abrogated by Treg depletion. Finally, we observed that PTCy did not abrogate graft-versus-leukemia effects.

INTRODUCTION

Graft-versus-host-disease (GVHD) remains a serious limitation of allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT).^{1,2} However, GVHD occurrence has also been associated with graft-versus-leukemia (GvL) effects, the main mechanism of cure after allo-HCT.^{3–5} While the association of a calcineurin inhibitor and an antimetabolite with or without anti-thymocyte globulins (ATG) has remained the standard GVHD prophylaxis in the last decades,^{6,7} post-transplant administration of cyclophosphamide (PTCy) has proven to be an efficient way to prevent GVHD, not only in the HLA-haploidentical allo-HCT setting but also in HLA-matched or 1/10 HLA-mismatched allo-HCT.^{8–12} However, the precise mechanisms of GVHD prevention by PTCy (and particularly the potential role of regulatory T cells (Treg)) remains debated.

Two seminal studies have investigated the anti-GVHD mechanisms of PTCy. First, using two mouse-to-mouse models of GVHD, Ganguly et al. demonstrated that effective GVHD prevention by PTCy required the presence of Treg which were found to be relatively resistant to PTCy.¹³ Secondly, Kanakry et al. observed that PTCy decreased conventional T cells but favored Treg recovery in patients given PTCy-based GVHD prophylaxis. This was attributed to a protective expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH) by Treg.¹⁴ Accordingly, another recent study evidenced higher Treg counts but lower naive T-cell counts in patients given PTCy-based GVHD prophylaxis, as well as an overexpression of multiple inhibitory receptors on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in PTCy-treated patients.¹⁵ In contrast, a recent large study observed comparable Treg recovery with PTCy and ATG-based GVHD prophylaxis.¹⁶ Further, a recent nice systems biology analysis in patients given PTCy-based GVHD prophylaxis demonstrated that signatures of active and highly suppressive Treg were paradoxically enriched in patients experiencing acute GVHD.¹⁷

In the last decades, many advances have been made in our understanding of the pathogenesis of xenogeneic GVHD (xGVHD) induced by the injection of human peripheral blood mononuclear cells (hPBMNC) in NOD.Cg-Prkdc^{cid} Il2rg^{tm1Wj}/SzJ (NSG) or in NOD/Shi-scid/IL-2R^γnl mice (“humanized” models of

¹Hematology Research Unit, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)-I³, University of Liège, Liège 4000, Belgium

²Department of Medicine, Division of Hematology, CHU of Liège, Liège 4000, Belgium

³Senior author

⁴Lead contact

*Correspondence: g.ehx@uliege.be (G.E.), f.baron@uliege.be (F.B.)

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106085>



GVHD). It was found that xGVHD is caused by the activation of mouse MHC-reactive human T cells by murine hematopoietic antigen-presenting cells.^{18,19} These activated T cells then upregulate the expression of genes involved in cell proliferation, T-cell receptor (TCR) signaling, co-stimulation, IL-2/STAT5, mTOR, and Aurora kinase A pathways (as observed in a non-human primate model of GVHD²⁰). Activated T cells then acquire a T-helper 1 phenotype and migrate to xGVHD-target organs (mainly the bone marrow (BM), lungs, and liver), causing the disease.²¹

We recently investigated the mechanisms of GVHD prevention by the mTOR inhibitor rapamycin in humanized mouse models.²² Looking at strategies that could potentiate the anti-GVHD mechanisms of rapamycin, we observed that PTCy mitigated xGVHD and thereby confirmed the initial observation by Kanakry et al.¹⁴ Further, we observed higher frequencies of Treg in PTCy-treated mice on day 21 after hPBMC infusion. These initial observations prompted us to decipher herein the impact of PTCy on xGVHD and GvL effects with a special focus on Treg in humanized mouse models of GVHD.

RESULTS

Post-transplant administration of cyclophosphamide delays xenogeneic graft-versus-host disease

We first confirmed our prior observations that a single PTCy injection (100 mg/kg on day 3) prevented xGVHD induced by injecting hPBMC in NSG mice ($n = 21$). We confirmed higher survival ($p = 0.01$), lower GVHD scores ($p = 0.0028$), and lower weight loss ($p = 0.01$) in PTCy-treated mice. Combined data from the two experiments (a total of 16 control and 17 PTCy mice) are presented in Figures 1A–1C. Median survival in control and PTCy-treated mice was 43 and 66 days, respectively ($HR = 4.139$; $p < 0.0001$). We also confirmed higher Treg (defined as $CD4^+CD25^+FOXP3^+$) frequencies in the peripheral blood on day 21 in PTCy-treated mice (median of 9.26 versus 2.75%, $p = 0.0001$) (Figure 1D). We next compared organ infiltration by human T cells in mice sacrificed on day 21 after hPBMC infusion and given ($n = 19$) or not ($n = 18$) PTCy. We observed lower human chimerism levels in the blood and the lungs, but not in the liver, BM, or spleen of PTCy-treated mice (Figure 1E). It should be stressed that human chimerism was lower in the BM than in the spleen or blood of each PTCy and control mice, in concordance with previous observations made in NSG mice infused with hPBMC without sub-lethal irradiation.¹⁸ There was a higher frequency of Treg among $CD4^+$ T cells in all organs except for the BM (Figure 1F). Further, Treg from PTCy-treated mice exhibited higher FOXP3 (Figures 1G and 1H) and CD25 (Figure 1H) expression than those from control mice, reflecting a more suppressive Treg phenotype. This was associated with higher expression of IL-2 by $CD4^+$ T cells in PTCy-treated mice (Figure 1I). Comparing serum cytokine levels on day 28 after hPBMC infusion in another cohort of mice, we observed higher IL-2 but lower IFN-gamma and TNF-alpha serum concentrations in PTCy-treated mice (Figure 1J).

We next compared T-cell engraftment kinetics in control and PTCy-treated mice. We observed that human chimerism increased from day seven to day 21 and that this increase was higher in control than in PTCy-treated mice. Indeed, on day seven, human chimerism levels were higher in PTCy-treated mice (most probably reflecting the negative impact of cyclophosphamide on mouse hematopoiesis) while the opposite was seen on day 21 (reflecting the eradication of human proliferative T cells by PTCy; Figure S1A). Interestingly, Treg frequencies were higher in control mice on day seven, comparable in both groups on day 14, and higher in PTCy-treated mice on day 21 (Figure S1B). Proliferative $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were less frequent on day seven but more frequent on day 14 in PTCy-treated mice than in control mice (Figures S1C and S1D). As previously reported by other investigators,²³ there was an important decrease in the proportions of naive T cells (T_{naive}) among both $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subsets from day 14 to day 21 after hPBMC infusion. In addition, among $CD4^+$ T cells, there were higher proportions of T_{naive} but lower proportions of effector T cells (TEFF) on days 14 and 21 in PTCy-treated than in control mice. Further, PTCy-treated mice had also higher proportions of central memory T cells (TCM) on day 14 (Figure S1E). Similarly, there were higher proportions of T_{naive} but lower proportions of TEFF on days 14 and 21 among $CD8^+$ T cells in PTCy-treated mice (Figure S1F). This observation is consistent with the higher proportion of IL-2 produced by $CD4^+$ T cells as T_{naive} and TCM produce more IL-2 than TEFF (Figure S1G). Thus, the Treg increase observed in PTCy-treated mice seems to be induced by higher IL-2 secretion by conventional T cells (T_{conv}). Finally, it should be stressed that while we consistently observed lower Treg frequencies

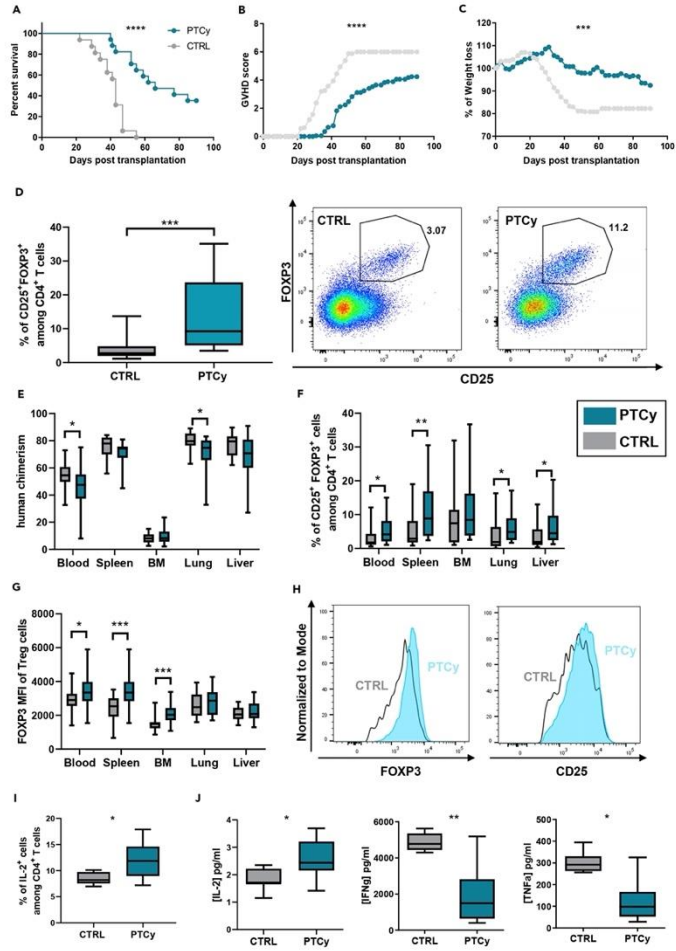


Figure 1. PTCy delays xGVHD

(A–D) In two independent cohorts NSG mice were transplanted with 2×10^7 hPBMC from two different healthy donors and were treated (blue, $n = 17$) or not (gray, $n = 14$) with PTCy (100 mg/kg) on day three. Mice were monitored for survival, GVHD score and weight loss, and flow cytometry analyses were performed on peripheral blood on day 21. (A) Comparison of survival curve, (B) xGVHD score, and (C) weight loss between control and PTCy-treated mice. Mice that reached a score of six were estimated to have terminal GVHD and were sacrificed. The final score for dead animals reaching the ethical limit score was kept in the dataset for the remaining time points (last observation carried forward). (D) Comparison of Treg frequencies (defined as CD25⁺FOXP3⁺) among CD4⁺ T cells and representative dot plot of concatenated CD4⁺ T cells showing Treg frequencies in control and PTCy-treated mice. (E–H) In two independent cohorts (CTRL, $n = 18$ and PTCy, $n = 19$), mice were sacrificed at day 21, and flow cytometry analyses were performed on peripheral blood, spleen, BM, lung, and liver. (E) Comparison of human chimerism (calculated as the ratio of human CD45⁺ cells vs. murine + human CD45⁺ cells). (F) Treg frequencies among CD4⁺ T cells, and (G) FOXP3 MFI of Treg cells in xGVHD target organs. (H) Representative histogram of concatenated Treg from one cohort (CTRL, $n = 10$ and PTCy, $n = 11$) showing the expression of FOXP3 (left panel) and CD25 (right panel) between groups in the spleen. (I and J) In an independent cohort (CTRL, $n = 8$ and PTCy, $n = 8$) human cytokine levels were analyzed on day 21 by flow cytometry and on day 28 by Luminex assay. (I) Comparison of IL-2⁺ cells among CD4⁺ T cells. (J) Comparison of indicated cytokine serum concentration. Data show median values with min to max for boxplots. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). See also Figures S1 and S7.

on day 21 than on day 14, there were important variations among Treg frequencies observed between different hPBMC donors (Figure S1H).

Post-transplant administration of cyclophosphamide depletes proliferative (Kl67⁺) T cells including Kl67⁺ Treg

We next investigated the impact of PTCy on human T-cell subsets on day six after hPBMC infusion. In these experiments, mice were irradiated (2 Gy) on the day minus one, infused with 2×10^7 hPBMC on day zero, given or not a single dose of PTCy (100 mg/kg) on day three, and sacrificed on day six. Human chimerism was lower in the spleen but higher in the BM of PTCy-treated mice (Figures 2A and S2A). The latter was probably due to the toxicity of the cyclophosphamide on murine BM cells. In addition, there was a profound depletion of proliferating/activated T cells (i.e. Kl67⁺ and/or CD25⁺) in both organs (Figures 2A, 2B, and S2A). In contrast, non-proliferating (i.e. Kl67⁺ BCL-2⁺) T cells were not depleted by PTCy (Figures 2A, 2B, and S2A). Looking specifically at Treg subsets, we observed that PTCy depleted proliferative (Kl67⁺) splenic Treg but spared splenic Kl67⁺ Treg (Figures 2C and 2D). Interestingly, BM Tregs were not affected by PTCy (Figures S2B and S2C), possibly because of their lower Kl67 and higher BCL-2 expression (Figure S2D). Finally, probably as a consequence of the important human T-cell count reduction by PTCy, there was a dramatic decrease in the IL-2 and IFN-gamma serum levels of PTCy-treated mice (Figure S2E).

To confirm our *in vivo* experiments showing that PTCy depletes proliferative Treg, we investigated the impact of mafosfamide (a cyclophosphamide analog with an endogenous cytotoxic activity) on Tconv and Treg *in vitro*. First, we observed that mafosfamide had no impact on total T-cell counts when T cells were not stimulated. Conversely, the numbers of T cells decreased in a concentration-dependent manner following exposure to mafosfamide when they were activated with CD3/CD28 beads (Figure S3A). Looking at CD4⁺ T cells, both Tconv and Treg proliferated following activation with CD3/CD28 beads and the proportion of proliferative cells decreased following mafosfamide exposure (at either 4 or 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in both Tconv and Treg (Figures S3B–S3D). This observation demonstrates that Treg are impacted by mafosfamide. In summary, these results support our *in vivo* findings that proliferating Treg are sensitive to cyclophosphamide.

Single-cell RNA-sequencing analyses reveal that post-transplant administration of cyclophosphamide depletes proliferative T cells overexpressing the mTor and aurora pathways but also Treg

To further assess the impact of PTCy on T cells in our GVHD model, we performed single-cell RNA-sequencing on human T cells isolated from the spleen of control and PTCy-treated mice on day six after hPBMC injection. Cell cycle phase analyses revealed that T cells from control mice were proliferating, with equivalent cell proportions observed in the G1 and G2M phases, and a smaller proportion of cells in the S phase (Figure 3A). Conversely, T cells from PTCy-treated mice were almost all in the G1 phase confirming that proliferative T cells were depleted by PTCy.

The clustering analysis evidenced two non-proliferative (naive T cells and cytotoxic T cells) and three proliferating (proliferating cytotoxic T cells, Treg (that were mostly proliferating) and proliferating helper T cells) cell groups (Figures 3B–3D, S4A, and S4B). Cytotoxic T cells were characterized by CD8, NKG7, GZMB, PFRF1, and CCL5 expression (non-proliferative cytotoxic T cells) or similar expression plus MKI67

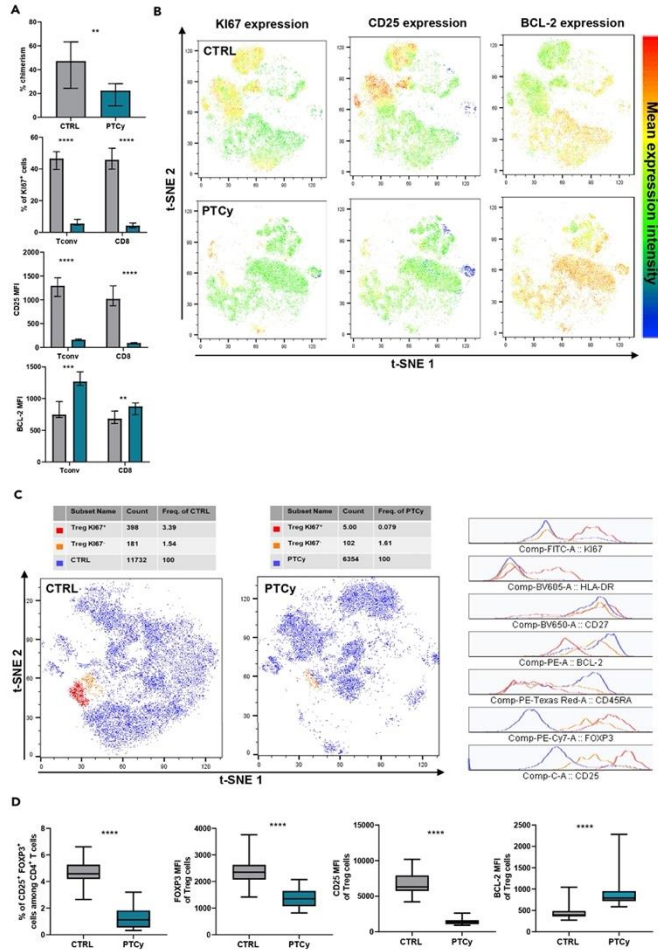


Figure 2. PTCy depletes proliferative (KI67⁺) T cells and Treg

In four independent cohorts of mice, two Gy irradiated NSG mice were transplanted with 2×10^7 hPBMC from four different healthy donors and were treated (n = 21) or not (n = 18) with PTCy (100 mg/kg) on day three. Mice were sacrificed on day six for flow cytometry analyses on the spleen.

- (A) Comparison of human chimerism, proliferative (i.e. KI67⁺) cells, CD25, and BCL-2 expression among Tconv and CD8⁺ T cells.
 (B) Representative t-SNE of concatenated human CD45⁺ cells from one mice cohort showing the expression of KI67 (left panel), CD25 (center), and BCL-2 (right panel) in the control group (n = 4) compared to the PTCy group (n = 4).
 (C) Representative t-SNE analysis of concatenated CD4⁺ T cells from one mice cohort showing Treg in the control group (n = 4) compared to the PTCy group (n = 4). Treg are divided into KI67⁺ (red) and KI67⁻ (orange).
 (D) Comparison of Treg frequencies among CD4⁺ T cells, comparison of FOXP3, CD25, and BCL-2 expression in Treg cells. Data show median values with min to max for boxplot or interquartile range for bar plot. (*p ≤ 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001). See also Figures S2 and S3.

expression (proliferative cytotoxic T cells). Proliferative helper T cells were characterized by CD4 and MKI67 expression and the absence of FOXP3 expression (Figure 3C). Tregs were characterized by the expression of FOXP3 and CTLA4. They also exhibited a high expression of other members of the "Treg gene signature" such as IL2RA and TNFRSF1B (TNFR2) (Figure 34C). Finally, naïve T cells were defined based on a high CCR7 expression and the absence of MKI67 expression. Interestingly, while the five T-cell subpopulations were present in the control mice, mainly naïve and non-proliferative cytotoxic T cells were present in PTCy-treated mice (Figures 3B–3D). Further, importantly, confirming flow cytometry analyses, Treg were extensively depleted by PTCy.

GSEA analyses comparing naïve T cells from control and PTCy-treated mice revealed that cells exposed to cyclophosphamide had a higher expression of P53 and of apoptosis pathways with BAX and BCL-2 being in the top 50 of the differentially expressed genes upregulated by PTCy (Figures 3E, S5A, and S5B). This demonstrates that PTCy, in addition to depleting proliferative T cells, also impacts the transcriptomic signature of naïve non-proliferating T cells. We then performed further GSEA analyses on CD8⁺ T cells comparing the transcriptome of non-proliferative to proliferative (which were depleted by PTCy) cytotoxic T-cell group. GVHD transcriptomic signatures such as Aurora kinase A and mTOR pathways^{20,21} were overexpressed in the proliferative cytotoxic T cell group, evidencing that PTCy depleted mainly cells causing xGVHD (Figures 3F, S5C, and S5D).

T-cell V beta repertoire sequencing analyses demonstrate that post-transplant administration of cyclophosphamide eradicates the most xenoreactive clones

Since PTCy depleted proliferative T cells *in vivo*, we hypothesized that this might impact the T cell V beta (TCRVB) receptor repertoire diversity. Therefore, we performed TCRVB sequencing (TCR-seq) on T cells isolated from the pre-transplantation hPBMC (donor T cells) or from mice organs at day 21 post-transplantation (injected or not with PTCy at day three). As previously reported by our group,²¹ the diversity of donor T cells at infusion was dramatically higher than in spleen or lung T cells (Figure 4A), demonstrating that xGVHD is mediated by a small fraction of T-cell clones expanding *in vivo* (most probably those recognizing mouse MHC by antigen mimicking).

While T-cell repertoires have been presumed to be almost entirely private, the development of high-throughput TCR sequencing has made clear that interindividual sharing of TCR clonotypes is more common than expected.^{24,25} Interestingly, a low frequency of highly common clones (neonatal TCRs) in donors is a predictor of GVHD development in recipients.²⁶ Therefore, we wondered whether xGVHD could be mediated by clones more or less common between donors. Hence, we compared the overlap of identity between clonotypes present in donor PBMC reported herein and in a previous article of our group (unrelated donor).²¹ The same comparison was made for T cells isolated from the spleen of NSG post-transplantation in both studies. In agreement with previous reports, the overlap between donor PBMC was close to 2% (1–8% similarity is typically observed).^{24,25} The comparison of spleens showed that the overlap of T-cell identity was greatly reduced (~4-fold) in comparison to the one found in PBMC (Figure 56). In summary, these data suggest that GVHD in NSG mice is mediated by more private clones, in concordance with recent findings in humans.²⁶

Next, we compared the control and treated animals and observed a less diverse repertoire in treated mice (Figure 4B). We hypothesized that the first and therefore most xenoreactive T-cell clones to react against mouse antigens are eliminated by PTCy in the early days of the treatment, sparing the less reactive ones. Following the expansion of these less reactive clones (which are expected to be mainly detected in treated mice by TCR-seq at day 21), this would result in two radically different T cell populations between control and treated animals. In concordance with this hypothesis, examining the identity of clonotypes between

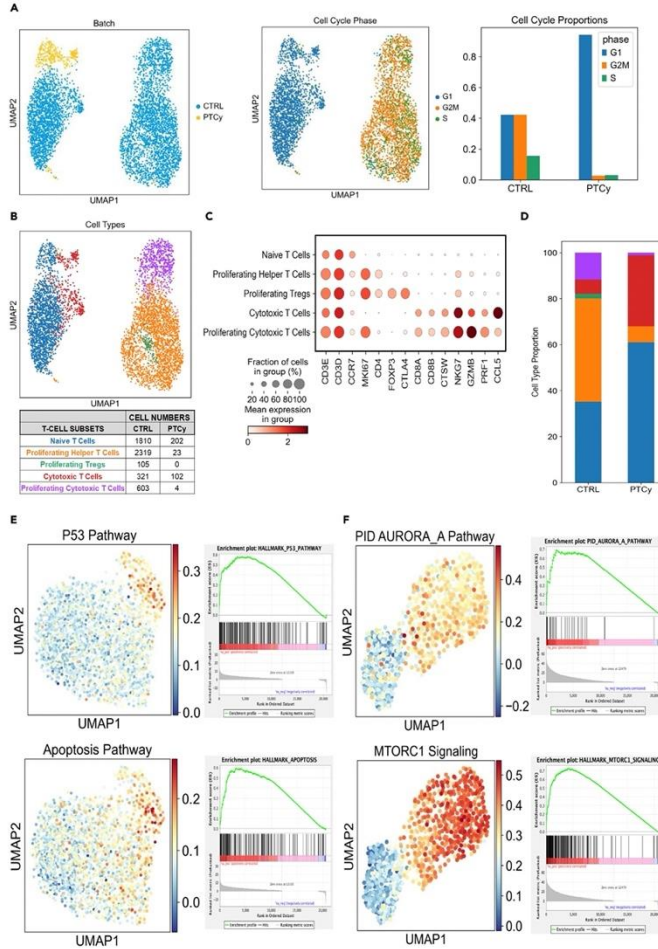


Figure 3. PTCy depletes proliferative T cells overexpressing the mTOR and Aurora pathways but also Treg

NSG mice were transplanted with 2×10^7 hPBMC and were treated (n = 4) or not (n = 3) with PTCy (100 mg/kg) on day three. CD3⁺ human T cells were isolated by immunomagnetic selection from mice spleen on day six and dead cell removal kit was used to exclude dead cells. Single-cell RNA-seq analysis was performed.

(A) UMAP visualization of cells from control (5275) and PTCy-treated mice (327) (left panel: blue = CTRL, orange = PTCy). UMAP visualization and proportions of G1, S, and G2M cell cycle phases in cells from control and PTCy-treated mice (center and right panel: blue = G1, orange = G2M, green = S).

(B–D) T cell subpopulations based on gene expression profile in control and PTCy-treated mice. (B) UMAP of five T-cells subpopulations: Naive (blue), proliferating helper (orange), proliferating Treg (green), cytotoxic (red), and proliferating cytotoxic (purple). (C) Heatmap showing specific marker gene expression in T-cell subpopulations. (D) Comparison of the proportion of each subpopulation in control and PTCy-treated mice.

(E) Enrichment plots of P53 (upper panel) and apoptosis (lower panel) pathways obtained from GSEA analysis contrasting naive cells from control and treated mice.

(F) Enrichment plots of mTOR (upper panel) and Aurora kinase A (lower panel) pathways obtained from GSEA analysis contrasting activated versus non-activated cytotoxic T cells in control mice. See also Figures S4 and S5.

both conditions, we found only a little overlap between the lungs of PTCy and control mice while there was a good correlation between the spleen and lungs of animals from the same condition (Figure 4C). Further, also supporting our hypothesis, a lower Ki67 expression was found in T cells of treated mice on day seven (reflecting the inhibition of the most xenoreactive clones) but a greater Ki67 expression was observed on day 14 (reflecting the unleashed proliferation of less xenoreactive clones spared by PTCy) (Figures S1C and S1D). Finally, we performed a differential expansion analysis of clonotypes between control animals and donor T cells. This provided the identity of significantly expanded clonotypes, which we defined as most xenoreactive ones, and those significantly contracted that we defined as bystanders. When comparing the overlap of identity between these two groups and clonotypes found in treated mice, we observed that bystanders were identified in significantly greater proportions in treated mice than xenoreactive clones, evidencing the elimination of xenoreactive clones by PTCy (Figure 4D). Next, we hypothesized that PTCy not only eliminated xenoreactive clones but also reduced the expansion of those having survived the treatment. To assess this, we identified the clonotypes significantly expanded in control or treated mice vs donor T cells. We observed that PTCy mice had significantly fewer expanded clonotypes than control animals among their whole repertoire (Figure 4E). Among the clonotypes significantly expanded in control mice (most xenoreactives), we selected those also detected in treated mice and compared their frequency between the two conditions (Figure 4F). We observed that these clonotypes were significantly less frequent in treated mice. Altogether, these results demonstrate that PTCy not only eradicates xenoreactive clones but also decreases their proliferation.

Low-dose IL-2 expands Treg following post-transplant administration of cyclophosphamide without providing additional graft-versus-host disease protection

It is now well established that IL-2 is the key homeostatic cytokine for Treg, preventing their apoptosis through MCL-1 expression^{27,28}. Consequently, we performed additional experiments aimed at assessing whether the administration of low-dose of IL-2 could (1) protect proliferative Treg from PTCy, (2) expand Treg following PTCy, and/or (3) protect against xGVHD. Specifically, three groups of mice were injected with 2×10^7 hPBMC. The first group did not receive any treatment, the second group received PTCy (100 mg/kg i.p.) on day three, and the third received PTCy (100 mg/kg i.p.) on day three and low-dose IL-2 (25,000 iU/mouse/day i.p.)²⁹ from days two to 15 after hPBMC infusion.

A first observation was that IL-2 administration failed to protect proliferative Treg from PTCy (Figure 5A). Indeed, t-SNE analyses demonstrated less Ki67⁺ Treg on day seven in PTCy-treated and PTCy + IL-2-treated mice than in control mice, with no apparent differences between the two PTCy groups.

A second observation was that low-dose IL-2 expanded Treg following PTCy, increasing their frequencies among CD4⁺ T cells and their absolute counts on days 14 and 21 after transplantation (Figures 5B and 5C). This was associated with higher pSTAT5 expression in Treg from the PTCy + IL-2 group at day 14 but also with higher pSTAT5 expression by CD8⁺ T cells (Figure 5D).

A third observation was that, unfortunately, Treg expansion by low-dose IL-2 failed to prevent xGVHD, perhaps because low-dose IL-2 also fueled CD25⁺CD8⁺ T cells. On the contrary, GVHD scores tended to be higher and survival lower in PTCy + IL-2 mice than in PTCy-treated mice (Figure 5E).

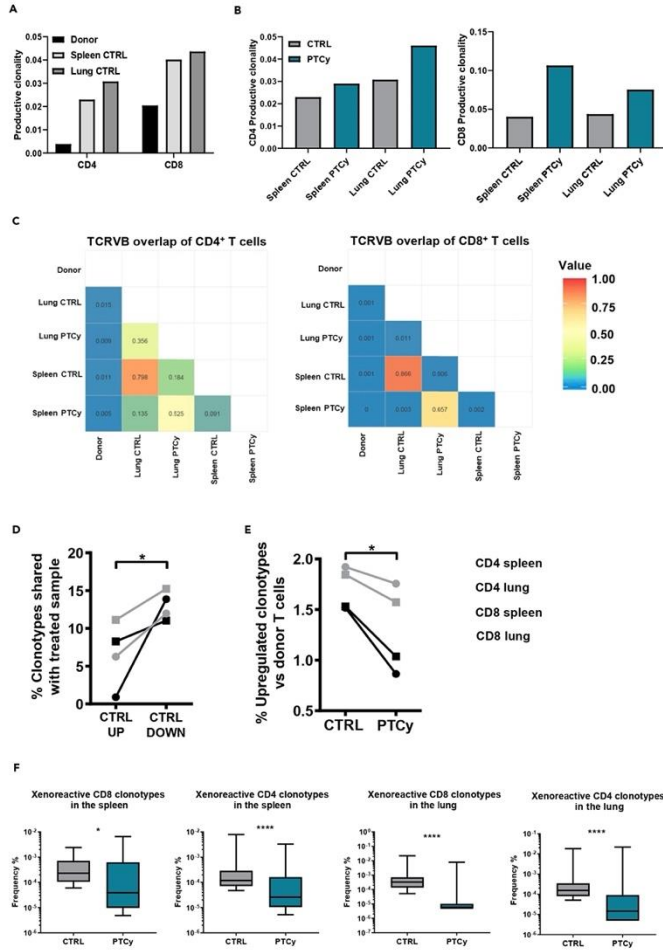


Figure 4. PTCy eradicates the most xenoreactive clones

NSG mice were injected with 2×10^7 hPBMC and treated ($n = 10$) or not ($n = 10$) with PTCy (100 mg/kg) on day three. Mice were sacrificed on day 21 for harvesting CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the spleen and lungs. DNA was extracted and TCRVβ sequencing analysis was performed.

- (A) Productive clonality (higher clonality indicates a less diverse repertoire) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells between the donor (before infusion to mice) and spleen/lungs from control mice.
- (B) Productive clonality of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the spleen and lung between control and PTCy-treated mice.
- (C) Heatmap of clonotypes overlap between samples calculated by Morista index for CD4⁺ T cells (left panel) and CD8⁺ T cells (right panel).
- (D) Proportion of CD4⁺ and CD8⁺ clonotypes upregulated (Up, = xenoreactive clonotypes) and clonotypes downregulated (Down, = bystanders) in control found in PTCy-treated mice.
- (E) Proportion of CD4⁺ and CD8⁺ clonotypes upregulated in spleen/lungs from control vs donor or from treated vs donor.
- (F) Frequency of CD4⁺ and CD8⁺ xenoreactive clonotypes from the spleen/lungs shared between control and PTCy-treated mice. Data show median values with min to max for boxplot. (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). See also Figure S6.

Treg are not mandatory for xenogeneic graft-versus-host disease attenuation by post-transplant administration of cyclophosphamide

We investigated whether Treg were required for xGVHD attenuation by PTCy. Therefore, we compared GVHD and immune parameters of mice transplanted with unmanipulated hPBMC (CTRL, $n = 7$) vs mice transplanted with CD25-depleted hPBMC and treated ($n = 10$) or not ($n = 10$) with PTCy. We observed that untreated mice given CD25-depleted hPBMC had exacerbated xGVHD in comparison to control mice, as previously observed by other group of investigators^{30,31} (Figure S7A). Furthermore, as expected, Treg frequencies were extensively lower in mice given CD25-depleted hPBMC than in those receiving unmanipulated hPBMC (Figures S7B and S7C). Importantly, we observed that PTCy still significantly mitigated xGVHD in mice infused with CD25-depleted hPBMC, demonstrating that Treg were not mandatory for xGVHD mitigation by PTCy (HR for survival 2.5, $p = 0.019$). However, it should be stressed that none of the 10 mice given CD25-depleted hPBMC and PTCy survived beyond day 90, while two control mice were given unmanipulated hPBMC survived. Accordingly, PTCy-treated mice given CD25-depleted hPBMC had significantly shorter survival than PTCy-treated mice transplanted with unmanipulated hPBMC in 3 independent cohorts including a total of 25 mice (median of 42 vs 66 days, $p = 0.0004$) (Figure S7D).

Taken together these results demonstrate that Treg are not mandatory for GVHD attenuation by PTCy. Nevertheless, it should be stressed that CD25-depletion exacerbated xGVHD in both control and PTCy-treated mice with the best survival being observed in mice receiving PTCy and unmanipulated hPBMC.

Post-transplant administration of cyclophosphamide depletes natural killer cells

Given that a recent systems biology analysis suggested an important role for NK cells in GvL effects in the setting of PTCy-based GVHD prophylaxis,¹⁷ we assessed the impact of PTCy on NK cells. Since human NK cells poorly engraft in NSG mice, we performed these experiments in NSG-IL-15 mice. Indeed, we reasoned that IL-15 could support NK cell engraftment in our mouse model, as observed when mice are infused with hematopoietic stem cells.³² Further, in this mouse strain model, human T- (particularly CD8⁺) cells are stimulated by IL-15 and do not depend only on IL-2 produced by activated T cells to proliferate (as in the classical NSG mouse model). In agreement with observations made in classical NSG mice, we observed that PTCy significantly decreased xGVHD and increased Treg proportions at day 30 also in NSG-IL15 mice (Figures 6A and 6B). Importantly, at day 10 we observed a significant depletion of NK cells (as well as of proliferative T cells) in PTCy-treated mice, demonstrating that NK cells were susceptible to PTCy *in vivo* (Figure 6C). Unfortunately, the frequencies of NK cells on day 21 were low in both groups, precluding the analysis of the long-term impact of PTCy on NK cells (Figure 6D).

Post-transplant administration of cyclophosphamide does not abrogate graft-versus-leukemia effects

Since we observed that PTCy ameliorated xGVHD and depleted NK cells we investigated whether PTCy would also abrogate the GvL effect. We addressed this important question in NSG-HLA-A2/HHd mice (a strain of NSG mice, that express the human HLA-A0201 in addition to mouse MHC) in order to have some common antigens between the mouse organs and the human AML cell line THP-1, as previously reported by our group.^{21,33} All mice were injected *i.v.* with THP-1 cells transfected with the luciferase gene on days zero and five. The reason for the first THP-1 injection was to have leukemic cells on board when PTCy was administered (mimicking clinical situations in which minimal residual disease or active leukemia would be present at the time of allo-HCT) and because of the sensitivity of THP-1 cells to

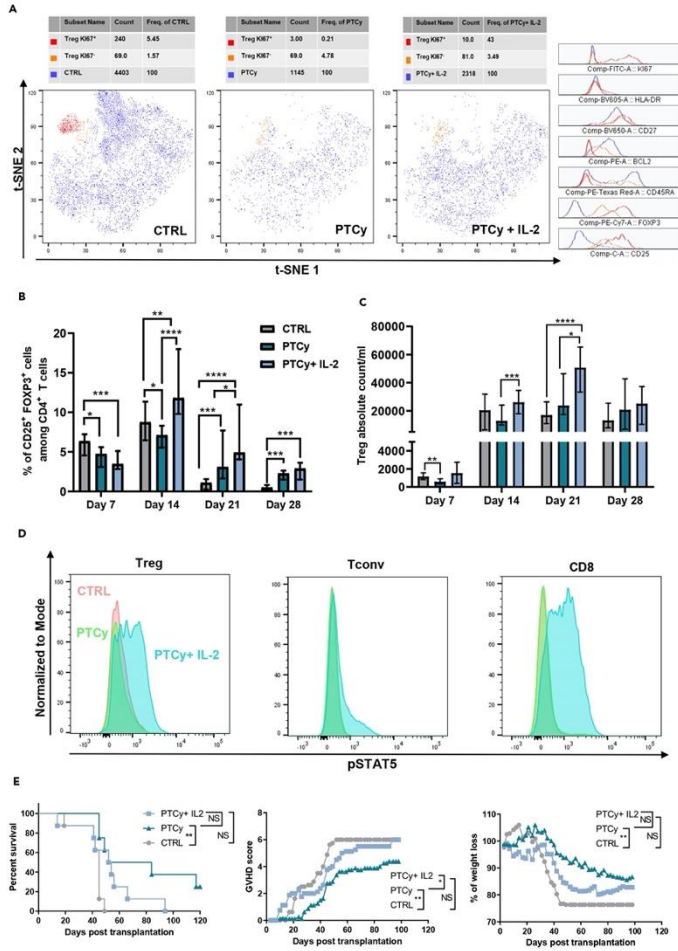


Figure 5. IL-2 expands Treg following PTcy without providing additional GVHD protection

In two independent cohorts, NSG mice were transplanted with 2×10^7 hPBMC from two different healthy donors and were treated with PTcy alone or PTcy in combination with human recombinant IL-2 25,000 IU/mice (CTRL, n = 16, PTcy n = 16, PTcy + IL-2 = 17) from day two to day 15. Mice were monitored for survival, GVHD score, weight loss, and flow cytometry analyses were performed on peripheral blood.

(A) Representative t-SNE of concatenated CD4⁺ T cells from one mouse cohort showing Treg cells on day seven in control (n = 8, left panel), PTcy (n = 8, center panel) and PTcy + IL-2 (n = 8, right panel) group. Treg are divided into KI67⁺ (red) and KI67⁻ (orange).

(B and C) Comparison of Treg frequencies among CD4⁺ T cells and (C) Treg count per mL at different time points.

(D) Representative histogram of concatenated Treg (left panel), Tconv (center panel), CD8⁺ T cells (right panel) from one mouse cohort showing the pSTAT5 expression on day 14 between the three groups (CTRL = pink, PTcy = green, PTcy + IL-2 = blue).

(E) Survival (left panel), GVHD score (center panel), and weight loss (right panel) of one mouse cohort (CTRL, n = 8, PTcy n = 8, PTcy + IL-2 = 8). Mice that reached a score of six were estimated to have terminal GVHD and were sacrificed. Data show median values with interquartile range for bar plot. (*p ≤ 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

cyclophosphamide. Four groups of mice were compared, a group of mice given only THP-1 cells, a second group given THP-1 cells and PTcy on day three, a third group given THP-1 cells and hPBMC from a non-HLA-A2 donor, and a fourth group given THP-1 cells, PTcy, and hPBMC from the same non-HLA-A2 donor. The best survival was observed in THP-1 + PTcy + hPBMC mice (Figure 7A). Bioluminescence analysis revealed that none of the THP-1 + hPBMC mice had detectable tumors while THP-1 + PTcy + hPBMC mice had detectable tumors but to a lesser extent than THP-1 only or THP-1 + PTcy mice (Figure 7B). We concluded from this experiment that, although decreased, GvL effects were not abrogated by PTcy.

DISCUSSION

Although PTcy is increasingly used as GVHD prophylaxis, how it prevents GVHD as well as its impact on GvL effects remain debated. Specifically, the role of Treg on GVHD mitigation by PTcy has been intensively studied.^{13,14,34} Here, we extensively studied the mechanisms of GVHD prevention by PTcy in three humanized mouse models of GVHD. Several important observations were made.

First, we confirmed that PTcy prevented xGVHD in NSG mice infused with hPBMC. We also observed such a protective effect of PTcy in NSG-HLA-A2-HDD mice, a model in which GVHD is induced by both xenogeneic and allogeneic reactions when hPBMC from non-HLA-A2 donors are infused,^{21,35} and in NSG-IL15 mice, a model in which infused human (CD8⁺) T cells are supported independently of IL-2.³⁶ Accordingly, serum levels of IFN-gamma and TNF-alpha were significantly decreased by PTcy in the NSG mouse model, as generally observed when successful anti-GVHD approaches are investigated.^{22,33}

An important observation of our study was that Treg were not required for GVHD protection by PTcy. Indeed, we observed that PTcy attenuated xGVHD in mice given CD25-depleted hPBMC while mouse peripheral blood analyses confirmed dramatically low Treg numbers on days seven and 14 in NSG mice injected with CD25-depleted hPBMC. These results are in contrast with those previously reported by Ganguly et al. in mouse-to-mouse models of experimental GVHD in which GVHD scores of mice given CD4⁺CD25^{high}-depleted grafts before PTcy were slightly lower but statistically similar to mice given CD4⁺CD25^{high}-depleted grafts without PTcy.¹³ Here, we hypothesize that this discrepancy could be ascribed to either fundamental differences between human and mouse immunology (particularly in regard of Treg biology³⁷), or perhaps to insufficient statistical power in the Ganguly et al. study to detect a statistically significant impact of PTcy in mice given CD4⁺CD25^{high}-depleted. However, in concordance with Ganguly et al. observations, we did observe a lower survival in PTcy mice given CD25-depleted hPBMC in comparison to PTcy mice given unmodified hPBMC. This demonstrates that Treg depletion exacerbates xGVHD and suggests.

The observation that Treg were not mandatory for GVHD reduction by PTcy prompted us to revisit the impact of PTcy on Treg. *In vitro* experiments demonstrated that activated/proliferating Treg were highly susceptible to mafosfamide (a cyclophosphamide analog). These observations were confirmed *in vivo* by the demonstration that PTcy depleted KI67⁺ Treg by flow cytometry experiments and by single-cell RNA-seq analyses. The latter identified only the fraction of “proliferative” Treg from the spleen at day six in control mice. These proliferative Treg were virtually absent at day six in the spleen of PTcy mice. These results are in contrast to prior observations by Kanakry et al. who proposed that Treg were resistant to PTcy following allogeneic hematopoietic cell transplantation because they acquired the expression of ALDH, as demonstrated by the authors in *in vitro* mixed lymphoid reactions.³¹

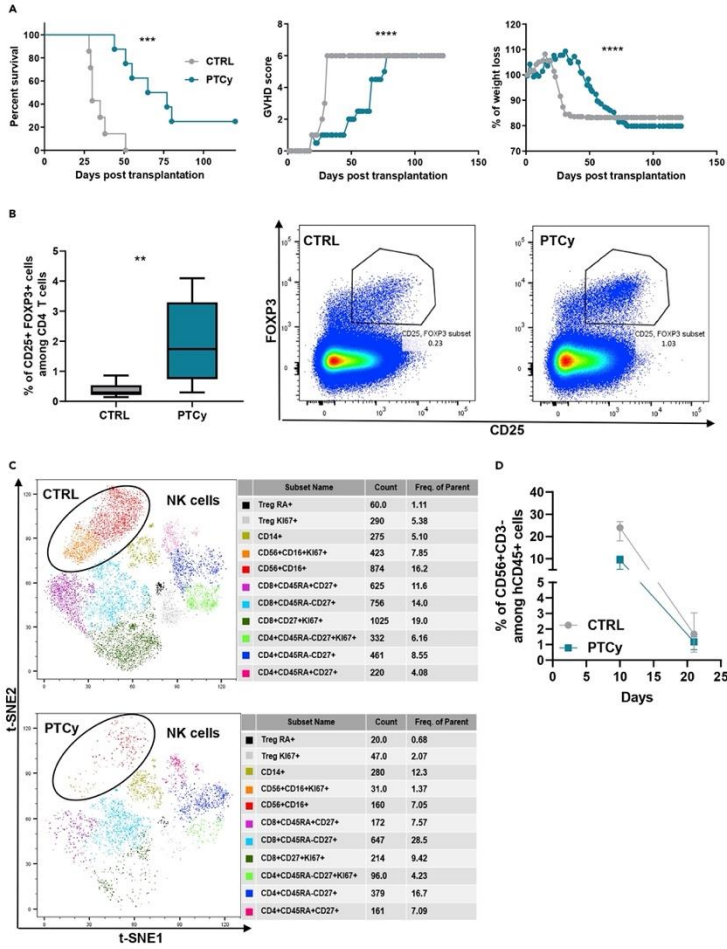


Figure 6. PTCy depletes NK cells

(A and B) NSG-IL15 mice were transplanted with 2×10^7 hPBMC and were treated (blue, $n = 8$) or not (gray, $n = 8$) with PTCy (100 mg/kg) on day three. Mice were monitored for survival, GVHD score, weight loss and flow cytometry analyses were performed on blood around day 30.

(C) NSG-IL-15 mice were transplanted with 1×10^7 hPBMC and were treated ($n = 4$) or not ($n = 4$) with PTCy (100 mg/kg) on day three. Flow cytometry analyses on peripheral blood were performed on day 10.

(A) Comparison of the survival curve, xGVHD score, and weight loss between control and PTCy-treated mice. Mice that reached a score of six were estimated to have terminal GVHD and were sacrificed.

(B) Comparison of Treg frequencies among CD4⁺ T cells (left panel), a representative dot plot of Treg cells from control and PTCy-treated mice (right panel).

(C) Representative t-SNE of concatenated human CD45⁺ cells in control ($n = 4$) and PTCy-treated mice ($n = 4$). NK cells are divided into two populations, proliferating NK cells (KI67⁺, orange) and non-proliferating NK cells (red).

(D) Evolution of the percentages of NK cells in the peripheral blood in NSG-IL15 mice injected with 10×10^6 hPBMC. Data show median values with min to max for boxplot. (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

The low IL-2 serum levels combined with the low FOXP3 and low CD25 levels in Treg from PTCy-treated mice on day seven prompted us to investigate whether the administration of low doses of IL-2 could attenuate xGVHD. We observed that low-dose IL-2 was very efficient at promoting the expansion of Treg that survived PTCy administration. In addition to inducing higher Treg proportions, IL-2 also increased their expression of CD25 and pSTAT5. These findings are consistent with what has been observed in chronic patients with GVHD benefiting from low-dose IL-2 therapy.^{38,39} Unfortunately, low doses of IL-2 also promoted CD8⁺ T cells which acquired high levels of pSTAT5 and, consequently, xGVHD was not improved. This is consistent with prior reports showing that activated CD8⁺ T cells and Treg could compete for IL-2 in inflammatory conditions,^{40,41} and with an elegant study by Perol et al. which showed that the administration of low-dose IL-2 expanded Treg in NSG mice infused with hPBMC but did not improve survival (with a trend to the contrary),⁷⁹ mirroring what we observed in our PTCy experiments.

Our results also evidenced the depletion of proliferative Tconv and proliferative CD8⁺ T cells by PTCy. These results are in concordance with those reported by Adhikary et al. who observed that PTCy (33 mg/kg at days 3 and 4) reduced the proportion of alloreactive T cells (defined as carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)^{low} T cells) six days after the injection of 2×10^7 CFSE-labelled hPBMC in NSG mice.³⁸ We further observed an accumulation of BCL-2-expressing T cells. Single-cell RNA-seq confirmed the depletion of proliferative T cells (including proliferative Treg as mentioned above) by PTCy. Importantly, the proliferative cytotoxic T-cell subpopulation depleted by PTCy overexpressed the AURORA kinase A and mTOR pathways which have been previously associated with a GVHD transcriptomic signature in non-human primates and in the NSG mouse model.^{20,21,42} Interestingly, we also noticed an overexpression of the P53 and apoptosis pathways by PTCy in T cells that survived the exposition to the drug. Consequently, higher proportions of naive T cells and TCM were observed in PTCy-treated mice following hPBMC infusion. This is significant since naive CD4⁺ T cells were the most IL-2-secreting cells in flow cytometry experiments on day 21.

Analyses of TCRVB repertoire confirmed our previous observation that a limited fraction of the T-cell population expands in NSG mice to mediate GVHD.²¹ In addition, comparing baseline and post-infusion T-cell repertoire between two PBMC donors revealed a particularly low overlap post-hPBMC infusion (even lower than between PBMC donor at baseline) showing that the clonotypes expanding in NSG mice are more private than those detected in PBMCs from healthy donors. Interestingly, this "private" response to xenogeneic antigens reflects what has been reported by other investigators for cytomegalovirus (CMV) infection as shared antigen exposure to CMV leads to fewer shared TCR β clones, indicative of a largely private response to major viral antigenic exposure.²⁴ Such private reaction to identical antigens (either vaccination or HIV infection) has even been demonstrated between identical twins, suggesting that it is not linked to pre-established genetic parameters.^{43,44} Further, importantly, we observed that PTCy significantly reduced the frequency of multiple xenoreactive T-cell clones, in agreement with the inhibition of highly proliferative T-cell populations observed by other methods. Interestingly, this result contrasts with a previous report showing that PTCy does not impact the TCRVB clonality in myeloablative allo-HCT recipients vs patients treated with methotrexate and a calcineurin inhibitor⁴⁵, this discrepancy could be due to the antiproliferative activity of their control treatments, similar to the effect of PTCy on the TCRVB repertoire.

Finally, using our xenogeneic/allogeneic humanized model of GVHD we investigated the impact of PTCy on GvL effects. Indeed, the impact of PTCy-based GVHD prophylaxis in patients with active disease at transplantation has remained debated and there are concerns that PTCy could not only prevent GVHD

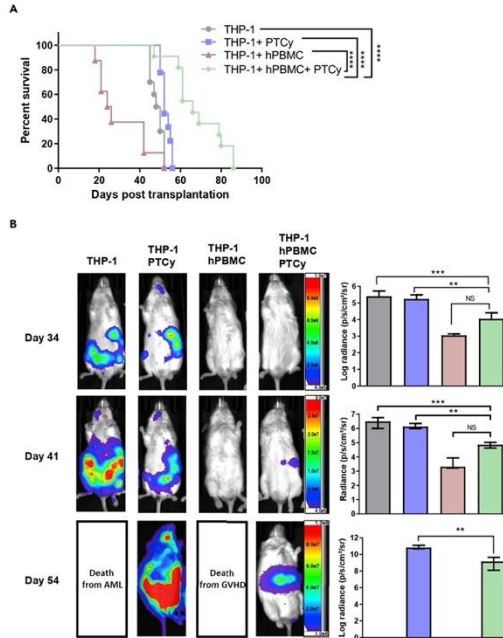


Figure 7. PTCy does not abrogate GvL effects
NSG-HLA-A2/HDD mice were transplanted with 3×10^6 THP-1-luc⁺ cells on day zero together or not with 2×10^7 hPBMC also on day zero. Mice were either treated or not with PTCy 100 mg/kg on day three and all mice received a second injection of 2×10^6 THP-1-luc⁺ cells on day five (THP-1, gray, n = 10 – THP-1+PTCy, blue, n = 9 – THP-1+hPBMC, red, n = 8 – THP-1+hPBMC + PTCy, green, n = 11). Survival and bioluminescence were monitored.
(A) survival curve between the four groups.
(B) Images follow-up of one representative mouse from each group are shown with photon flux (photons/sec) measured from the ventral view (region of interest was drawn over the entire body of each mouse). THP-1+hPBMC mice do not develop tumors, photon flux observed corresponding to signal background. The right panels show the comparison of bioluminescence between groups. Data show median values with interquartile range (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005).

but also abrogate GvL effects in this context. We observed that although PTCy reduced GvL effects, it did not abrogate them. Consequently, the best survival was observed in mice treated by PTCy (which were somewhat protected from GVHD and still exhibited some GvL effects) while mice not infused with hPBMC died of leukemia, and mice infused by hPBMC but not given PTCy died most probably because of GVHD. These observations are compatible with recent observations reported by investigators from the acute leukemia working party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation who demonstrated that GVHD occurrence did not correlate with GvL effects in patients given PTCy-based GVHD prophylaxis.⁴⁶ The slightly lower GvL effects observed after PTCy in our model might also be due to the destruction of NK cells by PTCy since IL-12-activated human NK cells have been shown to have an anti-leukemic activity

in NSG mice bearing THP-1 cells,⁴⁷ while significant concentrations of human IL-12 are present in NSG mice infused with hPBMC.⁴⁸ Supporting this hypothesis, a recent study in allo-HCT recipients given PTCy-based GVHD prophylaxis demonstrated lower relapse incidence and better overall survival in patients with NK cell counts >50.5 cells/ μ L on day 28 after transplantation.¹⁷ Further, in that study, among HLA-haploidentical transplant recipients, patients who experienced early relapse displayed a loss of inflammatory gene signatures in their NK cells.

In conclusion, extensive analyses of mechanisms of xGVHD prevention by PTCy revealed that cyclophosphamide works mainly by the depletion of proliferative xenoreactive T cells. Despite proliferative Treg are also depleted by PTCy, Treg proportion was more abundant and Treg expressed higher levels of FOXP3 and CD25 in PTCy than in control mice 21 days after hPBMC injection. This was due to higher IL-2 levels in PTCy-treated mice, which in contrast had lower levels of IFN-gamma and TNF-alpha, two cytokines highly correlated with xGVHD severity.

Limitations of the study

We acknowledge some limitations in our study. First, the humanized GVHD models used in this study were not fully humanized since only the T-cell compartment was stably engrafted following PBMC injection, even in NSG-IL-15 mice. Secondly, given that the xGVHD reactions were mediated against many MHC antigens we had to assume that most proliferative T cells at the time of GVHD were xenoreactive T cells (or xenoreactive or alloreactive T cells in the experiments with the NSG-HLA-A2/HHd mice). However, repertoire analyses clearly demonstrated that only a minority of TCR clones expanded after hPBMC infusion in NSG mice while there were no correlations between clonotype frequencies at injection and those recovered in the mice 21 days after the injection suggesting that most proliferative T cells in these humanized models were indeed xenoreactive.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
 - Primary cell culture
- METHOD DETAILS
 - Induction of xGVHD and PTCy administration
 - Flow cytometry
 - Serum cytokine levels
 - CFSE proliferation assay
 - TCR repertoire diversity
 - Single cell RNA-Seq
 - GvL effects and bioluminescence imaging
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106085>.

ACKNOWLEDGMENTS

CR, J Co, LC, and BV are Televie Research Fellow, CB is a Medical Doctor Applicant for an MSc and a Ph.D., GE is a Postdoctoral Researcher and FB is a senior research associate at the Fund for Scientific Research (F.R.S.–FNRS) Belgium. The study was funded by grants from the Stichting Tegen Kanker - Fondation contre le Cancer Belgium (grant # FAF-C/2016/844), by the Fund for Scientific Research (F.R.S.–FNRS) Belgium (grant # T.0016.20), by the University of Liège, as well as by the Leon Fredericq fund and the Anti-Cancer Center from the University of Liège. We are grateful to Sandra Ormense, Raafat Stephan,



and Céline Vanvinge from the Imaging and Flow Cytometry Platform and to Latifa Karim and Arnaud Lavergne from the Genomic platform of the GIGA for their help with flow cytometry/transcriptomic analyses.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Design of the project: FB, CR, GE.

Inputs on the project design: SS, JCa, YB.

Mouse experiments: CR, JCo, SD, LC, CB, BV.

Flow cytometry experiments and interpretations: CR, GE, FB.

Single-seq RNA seq analyses: MCK, CR, JCa.

TCRVB repertoire analyses: GE.

Figures: CR, MCK, GE.

Ms writing: FB, CR.

Ms editing and approval: all authors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: September 30, 2022

Revised: December 12, 2022

Accepted: January 25, 2023

Published: January 31, 2023

REFERENCES

- Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2017). Acute graft-versus-host disease - biologic process, prevention, and therapy. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2167-2179. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1609337>.
- Socié, G., and Ritz, J. (2014). Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* **124**, 374-384. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-514752>.
- Weiden, P.L., Sullivan, K.M., Flournoy, N., Storb, R., and Thomas, E.D.; Seattle Marrow Transplant Team (1991). Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **304**, 1529-1533. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106183042507>.
- Baron, F., Maris, M.B., Sandmaier, B.M., Storer, B.E., Sorror, M., Diaconescu, R., Woolfrey, A.E., Chauncey, T.R., Flowers, M.E.D., Mielcarek, M., et al. (2005). Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1993-2003. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.136>.
- Baron, F., Labopin, M., Niederwieser, D., Vigouroux, S., Cornelissen, J.J., Malm, C., Vindelov, L.L., Blaise, D., Janssen, J.J.W.M., Petersen, E., 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**, 2462-2468. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.135>.
- Storb, R., Antin, J.H., and Cutler, C. (2010). Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, S18-S27. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.016>.
- Baron, F., Mohty, M., Blaise, D., Socié, G., Labopin, M., Esteve, J., Ciceri, F., Giebel, S., Gorin, N.C., Savani, B.N., et al. (2017). Antithymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* **102**, 224-234. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.148510>.
- Kanakry, C.G., Fuchs, E.J., and Luznik, L. (2016). Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 132. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.234>.
- Brissot, E., Labopin, M., Moiseev, I., Cornelissen, J.J., Meijer, E., Van Gorkom, G., Rovira, M., Ciceri, F., Griskevicius, L., Blaise, D., et al. (2020). Post-transplant cyclophosphamide versus antithymocyte globulin in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission undergoing allogeneic stem cell transplantation from 10/10 HLA-matched unrelated donors. *J. Hematol. Oncol.* **13**, 87. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00923-0>.
- Dholaria, B., Labopin, M., Sanz, J., Ruggeri, A., Cornelissen, J., Labusière-Wallet, H., Blaise, D., Forcade, E., Chevallier, P., Grassi, A., et al. (2021). Allogeneic hematopoietic cell transplantation with cord blood versus mismatched unrelated donor with post-transplant cyclophosphamide in acute myeloid leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 76. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01086-2>.
- Shaw, B.E., Jimenez-Jimenez, A.M., Burns, L.J., Logan, B.R., Khimani, F., Shaffer, B.C., Shah, N.N., Mussetter, A., Tang, X.-Y., McCarty, J.M., et al. (2021). National marrow donor program-sponsored multicenter, phase II trial of HLA-mismatched unrelated donor bone marrow transplantation using

- post-transplant cyclophosphamide. *J. Clin. Oncol.* 39, 1971–1982. <https://doi.org/10.1200/JCO.2019.03502>.
12. Baron, F., Labopin, M., Tischer, J., Ciceri, F., Raiola, A.M., Blaise, D., Sica, S., Vydra, J., Fanin, R., Stözl, F., et al. (2022). HLA-haploidentical transplantation for relapsed/refractory AML: better LFS with BM than with PBSCT in patients \geq 55 years of age. *Am. J. Hematol.* 97, 1065–1074. <https://doi.org/10.1002/ajh.26627>.
 13. Ganguly, S., Ross, D.B., Panoskalis-Mortari, A., Kanakry, C.G., Blazar, B.R., Levy, R.B., and Luznik, L. (2014). Donor CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells are necessary for posttransplanted cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood* 124, 2131–2141. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-525873>.
 14. Kanakry, C.G., Ganguly, S., Zahurak, M., Bolaños-Meade, J., Thoburn, C., Perkins, B., Fuchs, E.J., Jones, R.J., Hess, A.D., and Luznik, L. (2013). Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci. Transl. Med.* 5, 211ra157. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006960>.
 15. Zhao, C., Bartock, M., Jia, B., Shah, N., Claxton, D.F., Wirk, B., Rakaszewski, K.L., Nickolich, M.S., Nank, S.G., Rybka, W.B., et al. (2022). Post-transplant cyclophosphamide alters immune signatures and leads to impaired T cell reconstitution in allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J. Hematol. Oncol.* 15, 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01287-3>.
 16. Massoud, R., Gagelmann, N., Fritzsche-Friedland, U., Zeck, G., Heidenreich, S., Wolschke, C., Ayuk, F., Christopiet, M., and Kröger, N. (2022). Comparison of immune reconstitution between anti-T-lymphocyte globulin and post-transplant cyclophosphamide as acute graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic myeloablative peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica* 107, 857–867. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.271445>.
 17. McCurdy, S.R., Radojic, V., Tsai, H.-L., Vulich, A., Thompson, E., Ivecic, S., Kanakry, C.G., Powell, J.D., Lohman, B., Adom, D., et al. (2022). Signatures of GVHD and relapse after post-transplant cyclophosphamide revealed by immune profiling and machine learning. *Blood* 139, 608–623. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013054>.
 18. King, M.A., Covassin, L., Brehm, M.A., Racki, W., Pearson, T., Leif, J., Laning, J., Fodor, W., Foreman, O., Burzenski, L., et al. (2009). Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene model of xenogenic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 104–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03933.x>.
 19. Kawasaki, Y., Sato, K., Hayakawa, H., Takayama, N., Nakano, H., Ito, R., Mashima, K., Oh, I., Minakata, D., Yamasaki, R., et al. (2018). Comprehensive analysis of the activation and proliferation kinetics and effector functions of human lymphocytes, and antigen presentation capacity of antigen-presenting cells in xenogenic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 24, 1563–1574. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.04.016>.
 20. Furlan, S.N., Watkins, B., Tkachev, V., Flynn, R., Cooley, S., Ramakrishnan, S., Singh, K., Giver, C., Hamby, K., Stempora, L., et al. (2015). Transcriptome analysis of GVHD reveals aurora kinase A as a targetable pathway for disease prevention. *Sci. Transl. Med.* 7, 315ra191. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3231>.
 21. Ehx, G., Somja, J., Wamatz, H.-J., Ritacco, C., Hannon, M., Delens, L., Fransolet, G., Delvenne, P., Muller, J., Beguin, Y., et al. (2018). Xenogenic graft-versus-host disease in humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHd mice. *Front. Immunol.* 9, 1943. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01943>.
 22. Ehx, G., Ritacco, C., Hannon, M., Dubois, S., Delens, L., Willems, E., Senois, S., Dion, P., Beguin, Y., and Baron, F. (2021). Comprehensive analysis of the immunomodulatory effects of rapamycin on human T cells in graft-versus-host disease prophylaxis. *Am. J. Transplant.* 21, 2662–2674. <https://doi.org/10.1111/ajt.16305>.
 23. Ali, N., Flutter, B., Sanchez Rodriguez, R., Sharif-Paghaleh, E., Barber, L.D., Lombardi, G., and Nestle, F.O. (2012). Xenogenic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R β null mice display a T-effector memory phenotype. *PLoS One* 7, e44219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044219>.
 24. Johnson, S.A., Seale, S.L., Gittelman, R.M., Rytlewski, J.A., Robins, H.S., and Fields, P.A. (2021). Impact of HLA type, age and chronic viral infection on peripheral T-cell receptor sharing between unrelated individuals. *PLoS One* 16, e0249484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249484>.
 25. Soto, C., Bombardi, R.G., Kozhevnikov, M., Sinkovits, R.S., Chen, E.C., Branchizio, A., Kose, N., Day, S.B., Filikinton, M., Gural, M., et al. (2020). High frequency of shared clonotypes in human T cell receptor repertoires. *Cell Rep.* 32, 107882. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107882>.
 26. Trofimov, A., Brouillard, P., Larouche, J.-D., Séguin, J., Laverdure, J.-P., Brasey, A., Ehx, G., Roy, D.-C., Busque, L., Lachance, S., et al. (2022). Two types of human TCR differentially regulate reactivity to self and non-self antigens. *Science* 25, 104968. <https://doi.org/10.1016/j.sci.2022.104968>.
 27. Pierson, W., Cauwe, B., Policheni, A., Schlemmer, S.M., Franckaert, D., Berges, J., Humblet-Baron, S., Schönfeldt, S., Herold, M.J., Hildeman, D., et al. (2013). Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14, 959–965. <https://doi.org/10.1038/ni.2649>.
 28. Liston, A., and Gray, D.H.D. (2014). Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 154–165. <https://doi.org/10.1038/nri3605>.
 29. Pérol, L., Martin, G.H., Maury, S., Cohen, J.L., and Piaggio, E. (2014). Potential limitations of IL-2 administration for the treatment of experimental acute graft-versus-host disease. *Immunol. Lett.* 162, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.027>.
 30. Mutis, T., van Rijn, R.S., Simonetti, E.R., Aarts-Riemens, T., Emmelot, M.E., van Bloois, L., Martens, A., Verdonck, L.F., and Ebeling, S.B. (2006). Human regulatory T cells control xenogenic graft-versus-host disease induced by autologous T cells in RAG2- γ - γ - γ -immunodeficient mice. *Clin. Cancer Res.* 12, 5520–5525. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0035>.
 31. Hippen, K.L., Merkel, S.C., Schirm, D.K., Sieban, C.M., Sumstad, D., Kadlido, D.M., McKenna, D.H., Bromberg, J.S., Levine, B.L., Riley, J.L., et al. (2011). Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci. Transl. Med.* 3, 83ra41. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001809>.
 32. Ayyee, K.-E., Burzenski, L.M., Yao, L.-C., Keck, J.G., Greiner, D.L., Shultz, L.D., and Brehm, M.A. (2022). Enhanced development of functional human NK cells in NOD-scid-IL2R β (null) mice expressing human IL15. *Faseb. J.* 36, e22476. <https://doi.org/10.1096/fj.202200045R>.
 33. Ehx, G., Fransolet, G., de Leval, L., D'Hondt, S., Lucas, S., Hannon, M., Delens, L., Dubois, S., Dion, P., Beguin, Y., et al. (2017). Azacytidine prevents experimental xenogenic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *Oncotarget* 8, e1314425. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1314425>.
 34. Adhikary, S.R., Cuthbertson, P., Nicholson, L., Bird, K.M., Sligar, C., Hu, M., O'Connell, P.J., Slyuter, R., Alexander, S.I., and Watson, D. (2021). Post-transplant cyclophosphamide limits reactive donor T cells and delays the development of graft-versus-host disease in a humanized mouse model. *Immunology* 164, 332–347. <https://doi.org/10.1111/imm.13374>.
 35. Courtois, J., Ritacco, C., Dubois, S., Canti, L., Vandenhove, B., Seidel, L., Daulne, C., Caers, J., Serais, S., Beguin, Y., et al. (2021). Itacitinib prevents xenogenic GVHD in humanized mice. *Bone Marrow Transplant.* 56, 2672–2681. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01363-1>.
 36. Covington, M., He, X., Scuron, M., Li, J., Collins, R., Juvekar, A., Shin, N., Favata, M., Gallagher, K., Sarah, S., et al. (2020). Preclinical characterization of tacitinib (INC039110), a novel selective inhibitor of JAK1, for the treatment of inflammatory diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 885, 173505. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173505>.
 37. Ziegler, S.F. (2006). FOXP3⁺ of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 209–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090547>.

38. Matsuoka, K.I., Koreth, J., Kim, H.T., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., Murase, K., Cutler, C., Ho, V.T., Alyea, E.P., et al. (2013). Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* 5, 179ra43. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005265>.
39. Ritacco, C., Ehx, G., Grégoire, C., Daune, C., Willems, E., Servais, S., Beguin, Y., and Baron, F. (2021). High proportion of terminally differentiated regulatory T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 56, 1828–1841. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01221-0>.
40. Humblet-Baron, S., Franckaert, D., Dooley, J., Bornschein, S., Cauwe, B., Schönefeldt, S., Bossuyt, X., Matthys, P., Baron, F., Wouters, C., and Liston, A. (2016). IL-2 consumption by highly activated CD8 T cells induces regulatory T-cell dysfunction in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 200–209.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.1314>.
41. Abraham, S., Pahwa, R., Ye, C., Choi, J.-G., Pahwa, S., Jaggaiahari, S., Raut, A., Chen, S., Manjunath, N., and Shankar, P. (2012). Long-term engraftment of human natural T regulatory cells in NOD/SCID IL2 γ cnfl mice by expression of human IL-2. *PLoS One* 7, e51832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051832>.
42. Betts, B.C., Veerapathan, A., Pidala, J., Yang, H., Horna, P., Walton, K., Cubitt, C.L., Gunawan, S., Lawrence, H.R., Lawrence, N.J., et al. (2017). Targeting Aurora kinase A and JAK2 prevents GVHD while maintaining Treg and antitumor CTL function. *Sci. Transl. Med.* 9, eaa8269. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8269>.
43. Pogorely, M.V., Minervina, A.A., Touzel, M.P., Sycheva, A.L., Komech, E.A., Kovalenko, E.I., Karganova, G.G., Egorov, E.S., Komkov, A.Y., Chudakov, D.M., et al. (2018). Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 12704–12709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809642115>.
44. Yu, X.G., Lichtenfeld, M., Williams, K.L., Martinez-Picado, J., and Walker, B.D. (2007). Random T-cell receptor recruitment in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8 $^{+}$ T cells from genetically identical twins infected with the same HIV-1 strain. *J. Virol.* 81, 12666–12669. <https://doi.org/10.1128/JVI.01450-07>.
45. Kanakry, C.G., Coffey, D.G., Towler, A.M.H., Vucic, A., Storer, B.E., Chou, J., Yeung, C.C.S., Gocke, C.D., Robins, H.S., O'Donnell, P.V., et al. (2016). Origin and evolution of the T cell repertoire after posttransplantation cyclophosphamide. *JCI Insight* 1, e86252. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86252>.
46. Shimoni, A., Labopin, M., Angelucci, E., Blaise, D., Ciceri, F., Koc, Y., Gulbas, Z., Diez-Martin, J.L., Bruno, B., Castagna, L., et al. (2022). The association of graft-versus-leukemia effect and graft-versus host disease in haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide for AML. *Bone Marrow Transplant.* 57, 384–390. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01493-4>.
47. Cany, J., van der Waart, A.B., Spanholtz, J., Tordoir, M., Jansen, J.H., van der Voort, R., Schaap, N.M., and Dolstra, H. (2015). Combined IL-15 and IL-12 drives the generation of CD34(+)-derived natural killer cells with superior maturation and alloreactivity potential following adoptive transfer. *Oncimmunology* 4, e1017701. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1017701>.
48. Pyo, K.H., Kim, J.H., Lee, J.-M., Kim, S.E., Cho, J.S., Lim, S.M., and Cho, B.C. (2019). Promising preclinical platform for evaluation of immuno-oncology drugs using Hu-PBL-NSG lung cancer models. *Lung Cancer* 127, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.11.035>.
49. Hannon, M., Lechanteur, C., Lucas, S., Somja, J., Seidel, L., Belle, L., Bruck, F., Baudoux, E., Giet, O., Chantillon, A.-M., et al. (2014). Infusion of clinical-grade enriched regulatory T cells delays experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Transfusion* 54, 353–363. <https://doi.org/10.1111/trf.12279>.
50. SIMPSON, E.H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163, 688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>.
51. DeWitt, W.S., Emerson, R.O., Lindau, P., Vignali, M., Snyder, T.M., Desmarais, C., Sanders, C., Utsugi, H., Warren, E.H., McElrath, J., et al. (2015). Dynamics of the cytotoxic T cell response to a model of acute viral infection. *J. Virol.* 89, 4517–4526. <https://doi.org/10.1128/JVI.03474-14>.
52. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb00203.x>.
53. Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Rykin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Zivaldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>.
54. Wolf, F.A., Angerer, P., and Theis, F.J. (2018). SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.* 19, 15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1382-0>.
55. Setija, R., Farrell, J.A., Gennert, D., Schier, A.F., and Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat. Biotechnol.* 33, 495–502. <https://doi.org/10.1038/nbt.3192>.
56. Korsunsky, I., Millard, N., Fan, J., Slowikowski, K., Zhang, F., Wei, K., Baglaenko, Y., Brenner, M., Loh, P.-R., and Raychaudhuri, S. (2019). Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat. Methods* 16, 1289–1296. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0619-0>.
57. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C.-A., Kwok, I.W.H., Ng, L.G., Ginhoux, F., and Newell, E.W. (2018). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat. Biotechnol.* 37, 38–44. <https://doi.org/10.1038/nbt.4314>.
58. Traag, V.A., Waltman, L., and van Eck, N.J. (2019). From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci. Rep.* 9, 5233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41695-z>.
59. Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189–196. <https://doi.org/10.1126/science.1240501>.
60. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.



STAR METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<i>Antibodies</i>		
BV510 Mouse Anti-Human CD45	BD Biosciences	Cat#563204;RRID:AB_2738047
CD45 Monoclonal Antibody (30-F11), PE-Cyanine5, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat#15-0451-81; RRID:AB_468751
CD3 APC	BD Biosciences	Cat#345767; RRID:AB_2833003
CD4 Monoclonal Antibody (RPA-T4), eFluor™ 450	Thermo Fisher Scientific	Cat#48-0049-42; RRID:AB_1272057
PE/Cyanine7 anti-human CD8 Antibody	BioLegend	Cat#344712; RRID:AB_2044008
APC-Cy™7 Mouse Anti-Human CD8	BD Biosciences	Cat# 557834; RRID:AB_396892
PE Mouse Anti-Human CD8	BD Biosciences	Cat# 555635; RRID:AB_395997
FITC Mouse Anti-Human CD16	BD Biosciences	Cat# 555406; RRID:AB_395806
PE-CF594 Mouse Anti-Human CD45RA	BD Biosciences	Cat# 562326; RRID:AB_11152953
Brilliant Violet 785™ anti-human CD45RA Antibody	BioLegend	Cat# 304140; RRID:AB_2563816
BV650 Mouse Anti-Human CD27	BD Biosciences	Cat# 563228; RRID:AB_2744352
CD62L (L-Selectin) Monoclonal Antibody (DREG-56 (DREG56)), APC-eFluor™ 780, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat# 47-0629-42; RRID:AB_1582224
BB515 Mouse Anti-Human CD62L	BD Biosciences	Cat# 565037; RRID:AB_2744437
CD14 Monoclonal Antibody (61D3), eFluor™ 450, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat# 48-0149-42; RRID:AB_1272050
BUV395 Mouse Anti-Human CD25	BD Biosciences	Cat# 564034; RRID:AB_2738556
APC-R700 Mouse Anti-Human CD56	BD Biosciences	Cat# 565140
Brilliant Violet 605™ anti-human HLA-DR Antibody	BioLegend	Cat# 307640; RRID:AB_2561913
PE Mouse Anti-Human Granzyme B	BD Biosciences	Cat# 561142; RRID:AB_10561690
FITC Mouse anti-Human Granzyme B	BD Biosciences	Cat# 560211; RRID:AB_1645488
FOXP3 Monoclonal Antibody (236A/E7), PE-Cyanine7, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat# 25-4777-41; RRID:AB_2573449
PE-CF594 Mouse Anti-Human FoxP3	BD Biosciences	Cat# 562421; RRID:AB_11153143
Alexa Fluor® 488 anti-human FOXP3 Antibody	BioLegend	Cat# 320211; RRID:AB_430886
BD™ PE Mouse Anti-Human bcl-2	BD Biosciences	Cat# 340576; RRID:AB_400061
FITC Mouse Anti-Ki-67 Set	BD Biosciences	Cat# 556026; RRID:AB_396302
Alexa Fluor® 647 Mouse anti-Ki-67	BD Biosciences	Cat# 558615; RRID:AB_647130
Alexa Fluor® 700 Mouse anti-Ki-67	BD Biosciences	Cat# 561277; RRID:AB_10611571
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Stat5 (pY694)	BD Biosciences	Cat# 612599; RRID:AB_399882
IL-17A Monoclonal Antibody (eBio64DEC17), APC, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat# 17-7179-42; RRID:AB_1582221
BV650 Rat Anti-Human IL-2	BD Biosciences	Cat# 564166; RRID:AB_2738637
IFN gamma Monoclonal Antibody (4S.B3), PE-Cyanine7, eBioscience™	Thermo Fisher Scientific	Cat# 25-7319-82; RRID:AB_469682
APC Mouse Anti-Human HLA-A2	BD Pharmingen	Cat# 561341; RRID:AB_10646036

(Continued on next page)



<i>Continued</i>		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Alexa Fluor(R) 700 anti-human TNF-alpha	BioLegend	Cat# 502927; RRID:AB_2561314
eBioscience™ 7-AAD Viability Staining Solution	Thermo Fisher Scientific	Cat# 00-6993-50
Biological samples		
Healthy human peripheral blood (Buffy coat)	Croix rouge de Belgique	https://www.redcrossblood.org/biomedical-services/specialty-services/cell-and-gene-therapy-solutions/buffy-coats.html
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Recombinant Human IL-2	Peptotech	Cat# 200-02
Mafofamide Sodium Salt	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-211761
Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11131D
Cyclophosphamide (Endoxan)	Baxter	Cat# 10019095601
Proleukin® (Aldesleukin)	Prometheus	Cat# 65483011607
Beetle Luciferin, Potassium Salt	Promega	Cat# E1605
Ficoll® Paque Plus	Sigma-Aldrich	Cat# GE17-1440-03
Collagenase A from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich	Cat# 10103586001
DNase I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich	Cat# 11284932001
HBSS	Lonza	Cat#10-508F
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher Scientific	Cat#42401-018
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich	Cat#F9665-500ML
Human Serum	Sigma-Aldrich	Cat#H4522-100ML
Pen Strep	Thermo Fisher Scientific	Cat#15140122
L-Glutamine 200 mM	Thermo Fisher Scientific	Cat#25030081
eBioscience™ 10X RBC Lysis Buffer (Multi-species)	Thermo Fisher Scientific	Cat#00-4300-54
Critical commercial assays		
EasySep™ Human T Cell Isolation Kit	Stemcell Technologies	Cat# 17951
EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit II	Stemcell Technologies	Cat# 17851
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	Thermo Fisher Scientific	Cat# C34554
Human HS Cytokine A Premixed Mag Luminex Performance Assay,Analyte: IL-2, TNF-alpha, IFN-gamma	Bio-Techne Ltd	Cat# FCSTM09-03
EasySep™ Human Pan-CD25 Positive Selection and Depletion Kit	Stemcell Technologies	Cat# 17861
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# K182001
Chromium Single Cell 3' Reagent Kits v3	10x Genomics	Cat# PN-1000075
KAPA Library Quantification Kits	Roche	Cat# KK4824
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific	Cat#00-5523-00
eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail (plus protein transport inhibitors)	Thermo Fisher Scientific	Cat#00-4975-93
PerFix EXPOSE (Phospho-Epitopes Exposure kit)	Beckman Coulter	Cat#B26976

(Continued on next page)



<i>Continued</i>		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Deposited data		
TCRVB deep sequencing on human T cells isolated from humanized mice engrafted with human PBMC and treated or not with Cyclophosphamide post-transplantation	This study	https://doi.org/10.5281/zenodo.7061490
Single cell RNA-seq data on human T cells isolated from humanized mice engrafted with human PBMC and treated or not with Cyclophosphamide post-transplantation	This study	https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/E-MTAB-12188
Experimental models: Cell lines		
THP-1 transduced with lentiviral vectors allowing luciferase expression	our lab	https://www.tandfonline.com/doi/suppl/10.1080/2162402X.2017.1314425?scroll=top
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: NOD.Cg-Prkdc ^{cid} Il2rg ^{tm1Wj} /SzJ Common Name: NSG (The Jackson Laboratory	Strain #:00557,RRID:IMSR_JAX:00557
Mouse: NOD.Cg-Prkdc ^{cid} Il2rg ^{tm1Wj} Tg(HLA-A/H2-D/B2M)1Dvs/SzJ Common Name: NSG-HLA-A2/HHHD	The Jackson Laboratory	Strain #:014570,RRID:IMSR_JAX:014570
Mouse: NOD.Cg-Prkdc ^{cid} Il2rg ^{tm1Wj} Tg(LL15)1Sz/SzJ Common Name: NSG-Tg(Hu-LL15)	The Jackson Laboratory	Strain #:030890,RRID:IMSR_JAX:030890
Software and algorithms		
FlowJo	BD Life Sciences	https://www.flowjo.com/
GraphPad Prism 8	GraphPad Software	https://www.graphpad.com/
immunoSEQ® Analyzer	Adaptive Biotechnologies	https://www.immunoseq.com/analyzer/
QIAxcel Software	Qiagen	Cat#9021165
Cell Ranger (2.2.0)	10X Genomics	http://software.10xgenomics.com/single-cell/overview/welcome
scanpy package	Wolf, F Alexander et al., 2018 ⁵⁴	https://pypi.org/project/scanpy/
Seurat	Satija, R, Farrell J.A., et al., 2015 ⁵⁵	https://cran.r-project.org/web/packages/Seurat/index.html
Harmony	Korsunsky, Ilya et al., 2019 ⁵⁶	https://github.com/slowkow/harmony
UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction	Becht, Etienne et al., 2018 ⁵⁷	https://arxiv.org/abs/1802.03426#:~:text=UMAP%20(Uniform%20Manifold%20Approximation%20and,applies%20to%20real%20world%20data
Leiden clustering	Traag VA, Waltman L, van Eck NJ, 2019 ⁵⁸	https://cran.r-project.org/web/packages/leiden/vignettes/run_leiden.html
GSEA tool (4.2.3)	Subramanian, Aravind et al., 2005 ⁶⁰	https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp
xPONENT 4.0 software	Luminex	
Aura Imaging Software	spectral instruments imaging	https://spectralin vivo.com/software/

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Baron Frédéric (f.baron@uliege.be).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- Single-cell RNA-seq data are available in the BioStudies database (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/>) under accession number E-MTAB-12188 (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/E-MTAB-12188>). Nucleotide sequence data of TCRVB are available on Zenodo at <https://doi.org/10.5281/zenodo.7061490>. Accession numbers are listed in the [key resources table](#).
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Mice**

NSG, NSG-HLA-A2/HDD and NSG-Tg (Hu-IL15) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, ME, USA). Mice were housed in pathogen-free conditions in microisolator cages and fed standard rodent chow diet. Female and male mice aged between 8-14 weeks were used for experiments. Mice were euthanized with an injection of pentobarbital (Dolethal[®]; Vetoquinol, Niel, Belgium) injection followed by cervical dislocation. All animal experiments used in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee of the University of Liege, Belgium (file # 19-2114). The "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals," prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, was followed cautiously.

Primary cell culture

The study has been approved by the Comité d'Éthique Hospitalo-Facultaire Universitaire de Liège (project # 2020/17). Peripheral blood was obtained from buffy coats provided by the Belgian Red Cross. PBMC were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and resuspended in PBS+3%FBS staining buffer. CD3⁺ T cells were isolated with the EasySep[™] Human-T Cell Isolation Kit. Cells were counted with a Sysmex XS-800i and seeded in 96-well U bottom plates. Cells were cultured and activated in the presence of anti-CD3/CD28 beads (Bead-Cell ratio 1:10, 1:2) (Thermo Fisher) in RPMI 1640 medium, supplemented with L-glutamine (2mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (10 mg/mL), 5% human AB serum and 20 ng/mL IL-2 for 48h before stimulation with mafosfamide (an analog of cyclophosphamide with an endogenous activity).

METHOD DETAILS**Induction of xGVHD and PTCy administration**

NSG or NSG-HLA-A2/HHD mice, aged from eight to 14 weeks were injected intravenously (i.v.) with 2×10^7 human PBMC (hPBMC) obtained from buffy coat. NSG-Tg (Hu-IL15) mice were injected i.v. with 1×10^7 or 2×10^7 hPBMC. In most experiments, no conditioning was given with the exception of experiments looking at the impact of PTCy administration on day six (mice sacrificed on day six) for which mice received 2 Gy total body irradiation approximately 24 hours before injection of 2×10^7 hPBMC (irradiation was performed in these experiments to increase engraftment in order to have more cells to analyze for flow-cytometry and RNA-seq experiments). GVHD severity was evaluated by a scoring system that incorporates four clinical parameters including weight loss, posture (hunching), mobility and anemia, as previously reported.³⁷ Each parameter received a score of zero (minimum) to two (maximum). Mice were assessed for GVHD scores thrice weekly and monitored daily during the experiments. Mice reaching a GVHD score of 6/8 or having lost more than 20% of their initial weight were sacrificed. Final scores for dead animals reaching the ethical limit score (6/8) were kept in the data set for the remaining time points.

Cyclophosphamide (Endoxan, Baxter, Illinois, IL, USA), dissolved in NaCl 0.9%, was administered intraperitoneally (i.p.) at 100 mg/kg on day three. For the experiment of PTCy in combination with low dose recombinant human IL-2, NSG mice received from day two to day 15 Proleukine (Aldesleukin, Prometheus laboratories, California, CA, USA) at the dose of 25 000 IU/mice i.p. in addition or not to a

single injection of pTCy on day three. Finally, in order to study the impact of Treg on xGVHD prevention by pTCy, NSG mice were infused with CD25-depleted hPBMC. CD25 depletion of hPBMC was performed by immunomagnetic selection with the EasySep™ Human Pan-CD25 Positive Selection and Depletion Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada).

Flow cytometry

In most experiments, peripheral blood (PB) draws were systematically performed on days seven, 14, and 21 (as well as on day 28 in some experiments). In some experiments, mice were systematically sacrificed on day six or 21 and PB, spleen, and bone marrow (BM) as well as liver and lungs (for sacrifice on day 21) were harvested at the time of necropsy. PB was depleted of erythrocytes with the RBC lysis buffer (Thermo Fisher, Massachusetts, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Splenocytes were obtained by crushing the spleen, and BM cells by flushing femurs and tibiae. Lung- and liver-infiltrating cells were obtained after enzymatic and mechanic tissue digestion by mincing and incubating the organs for one hour in HBSS + 50 µg/mL DNase 1 (Roche, Basel, Switzerland) + 1mg/mL collagenase A (Roche). Digestions were stopped by washing twice with PBS + EDTA 10mM, pH = 7.3, and mononuclear white blood cells were obtained by Ficoll (GE Healthcare, Upsala, Sweden) gradient centrifugation. Cells from all organs were washed twice with PBS+3% FBS and were counted with ABX diagnostics - Micros 60 (AxonLab, Baden, Switzerland) before processing with the antibody staining. The antibodies used consisted of anti-CD45-BV510 (H130, Becton Dickinson (BD), New Jersey, NJ, USA); anti-CD3-APC (SK7, BD); anti-CD4-eFluor450 (RPA-T4, Thermo Fisher); anti-CD4-BV786 (SK3, BD); anti-CD8-PECy7 (SK1, Biolegend); anti-CD8-APC-Cy7 (SK1, BD); anti-CD8-PE (HIT8a, BD); anti-CD16-FITC (3G8, BD); anti-CD45RA-PE-CF594 (HI100, BD); anti-CD45RA-BV785 (HI100, Biolegend); anti-CD27-BV650 (M-T271, BD); anti-CD62L-APC-eFluor780 (DREG56, Thermo Fisher); anti-CD62L-BB515 (SK11, BD); anti-CD14-Efluor450 (61D3, Thermo Fisher); anti-CD25-BUV395 (2a3, BD); anti-CD56-APC-R700 (NCAM16.2, BD); anti-HLA-DR-BV605 (L243, Biolegend, California, CA, USA); anti-GRANZYME B-PE (GB11, BD); anti-GRANZYME B-FITC (GB11, BD); anti-FOXP3-AlexaFluor488 (206D, Biolegend); anti-FOXP3-PE-Cy7 (236A/E7, Thermo Fisher); anti-FOXP3-PE-CF594 (259D/C7, BD); anti-BCL-2-PE (100, BD); anti-Ki67-FITC (B56, BD); anti-Ki67-AlexaFluor647 (B56, BD); anti-Ki67-AlexaFluor700 (B56, BD); anti-phosphoSTAT5-Alexafluor647 (47/Stat5(pY694), BD) anti-IL-17-APC (eBio64DEC17, Thermo Fisher); anti-IL-2-BV650 (5344.111, BD); anti-IFNγ-PECy7 (4S.B3, Thermo Fisher); anti-TNF-α-F700 (MAb11, Biolegend). The following antibody specific for mouse antigens was used: anti-CD45-PECy5 (30-F11, BD). Mixes of extracellular antibodies were done in brilliant stain buffer (BD, 50 µL/sample). Cells were incubated with surface antibodies for 20 min at 4°C in the dark and washed twice with PBS+3% FBS. Intracellular and cytokines staining was performed by using the FOXP3 Staining Buffer Set according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher). For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4h in RPMI supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (10 mg/mL) and in the presence of PMA/ionomycin, brefeldin A, and monensin (Cell Stimulation Cocktail + Protein Transport Inhibitors, Thermo Fisher).

For pSTAT5 staining, the PerFix EXPOSE reagent kit (PFE, Beckman Coulter, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions.

Total cell counts of human CD45⁺ cells in PB were calculated based on the absolute number of white blood cells (counted by using ABX diagnostics - Micros 60) and on human cell chimerism (frequency of human CD45⁺ / (%_{human}CD45⁺ + %_{mouse}CD45⁺)). Data were acquired on FACS LSRFortessa (BD) and were analyzed with FlowJo v10.6.1 (BD). In gating strategies, Tregs were defined as CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells while the remaining CD4⁺ T cells were termed conventional T cells (T_{conv}). Naive T cells (T_{naive}) were defined as CD45RA⁺CD27⁺, effector T cells (TEFF) as CD45RA⁺CD27⁻, effector memory T cells (TEM) as CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻, and central memory T cells (TCM) as CD45RA⁺CD27⁺CD62L⁺ T cells.

Serum cytokine levels

The concentration of human cytokines (IL-2, TNF-α, IFN-γ) was determined in mouse serum on days 6 and 28, after a 2-fold dilution, using a custom Magnetic Luminex Performance Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The experiments were performed according to the manufacturer's recommendations, and results were acquired on the Luminex MAGPIX system and analyzed with the Luminex xPonent Software 4.0.

CFSE proliferation assay

T cells were labeled with CFSE 5 μ M (Thermo Fisher) just after their isolation and seeded in culture as mentioned above with CD3/CD28 beads (bead-cell ratio 1:10, 1:2). After 48h hours in culture, cells were treated or not with mafosfamide (Santa Cruz Biotechnology, Texas, TX, USA) at 4 or 8 μ g/mL overnight. Finally, cells were harvested and stained with 7-AAD and analyzed by flow cytometry on a CytoFLEX (Beckman Coulter) to measure the number of live cells/well. In addition, cells were stained with CD4, CD8, CD25, Ki67, FOXP3 to separate Tconv (CD4⁺FOXP3⁻) from Treg cells (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) and to analyze CFSE signaling in each cell population by flow cytometry. The inhibition of proliferation induced by mafosfamide was calculated with the following formula: $100 \times (1 - \%CFSE^{high} \text{ cells treated} / \%CFSE^{high} \text{ cells untreated})$.

TCR repertoire diversity

Spleens and lungs from 10 NSG mice per group (control or treated with 100 mg/kg PTCy) were collected at day 21, pooled together, and were stained with anti-CD45, -CD3, -CD4, and -CD8 antibodies for flow cytometry sorting on a FACS ARIA II (BD). A total of 3×10^6 CD45⁺CD3⁺CD4⁺ and CD45⁺CD3⁺CD8⁺ T cells were sorted from each organ. The same cell populations were also sorted before transplantation from the PBMC of the donor. DNA was extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher). One hundred fifty μ g from each sample were used for T-cell receptor V β (TCRV β) deep sequencing performed by Adaptive Biotechnologies (Seattle, Washington, WA, USA).

For data analysis, the productive clonality output of the ImmunoSeq analyzer of Adaptive Biotech was used as is. This clonality is computed by using Simpson's diversity index on the rearrangements able to encode a functional protein (productive). This includes only in-frame rearrangements and excludes those containing a stop codon or a frameshift mutation. The Simpson diversity index⁵⁰ is calculated by weighted arithmetic mean of each squared clone abundance, yielding values between zero and one (zero indicates greater diversity and one indicates lower diversity of the repertoire).

The differential expansion analyses used to identify xenoreactive clonotypes were made with the "Differential abundance" tool of the ImmunoSeq analyzer of Adaptive Biotech, with default parameters (two-sided binomial method, productive clonotypes only, nucleotide counts, minTotal = 10, benjamini-hochberg correction of p-values, significance set at 0.01). This tool compares two samples and identifies rearrangements (unique sequences) that have significantly increased or decreased in frequency. This comparison is performed through the usage of exact Fisher tests on the abundance values of each clonotype, against the null hypothesis that the population abundance of the clone is identical in the two samples compared. This method has been described in details in the section "identification of expanded and enriched effector T-cell clones" of reference.⁵¹ p-values of Fisher tests were corrected for multiple testing with the False Discovery Rate (FDR) method of Benjamini & Hochberg.⁵² Xenoreactive clonotypes were defined as clonotypes significantly (FDR<0.01) expanded in control mice organs vs donor PBMCs while bystanders were defined as clonotypes significantly contracted in mouse organs vs donor PBMCs.

Single cell RNA-Seq

Library preparation

Human CD3⁺ T cells were isolated by immunomagnetic selection on day +6 from spleen of mice injected with 2×10^7 hPBMC and treated or not with PTCy on day +3. Isolated cells were washed once with PBS +0.04% BSA. Cell concentration was adjusted to 1,000 total cells/ μ L and 13,300 cells were loaded on Chromium Controller (10X Genomics). Amplified cDNA quality controls were performed with an Agilent bioanalyzer and final library profiled were checked on Qiaxcel (Qiagen). Sequencing libraries were loaded in Illumina Novaseq sequencer with NovaSeq SP 100 v1 kit (Illumina, CA, USA) using the following read lengths: 28 bp for Read1 (16 bp Barcode +12 bp Randomer), 8 bp for Sample Index and 80 bp for Read2. Library quantification was processed with KAPA Library quantification kit (KAPA Biosystems).

Data pre-processing

Demultiplexing, alignment to a reference genome, and gene quantification steps were taken using Cell Ranger (2.2.0)⁵³ with a custom reference package based on the human reference genome GRCh38. Further data processing steps were conducted using Scanpy (1.8.2) library.⁵⁴ Viable cells were separated from the empty droplets by filtering based on genes number >350, counts number >500, and

mitochondrial proportion <20%. The raw counts were normalized using CPM normalization with the scale factor of 10^4 and transformed to log scale using \log_2 function from Scanpy library. Highly variable genes were selected with the flavor "Seurat"⁵⁵ and used for principal component analysis (PCA), for dimensionality reduction.

Identification of cell cycle states and cell types

For the identification of the cell types, batch correction is applied using the python version of Harmony (Harmony)⁵⁶ with default parameters. A neighborhood graph was generated using $n_{\text{neighbours}} = 15$ with cosine distance metric. The data were projected onto two-dimensional space using Uniform Approximation and Projection (UMAP) method.⁵⁷ Cells were grouped by Leiden clustering⁵⁸ and the highly expressed genes for each cluster were determined using rank_genes_groups function from Scanpy library with normalized data. To categorize the cells based on cell cycle states, Scanpy's $\text{score_genes_cell_cycle}$ function was performed with the marker genes defined by Tirosh et al.⁵⁹

Gene set scoring and enrichment analyses

scanpy's score_gene function was used to assign an overall expression score for each hallmark gene set. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed by using the GSEA (4.2.3) tool.⁶⁰

GvL effects and bioluminescence imaging

For GvL effect assessment, NSG-HLA-A2/HHD mice were co-injected with 3×10^6 luciferase-expressing THP-1 cells with or without 2×10^7 hPBMC from non-HLA-A02 donor on day 0. The hPBMC donors were selected by staining the hPBMC with anti-HLA-A2 APC (BB7.2, BD) antibodies. Mice were treated or not on day +3 with an i.p. injection of PTCy (100 mg/kg) and received a second injection of 2×10^6 THP-1 expressing luciferase on day +5. Survival and bioluminescence analyses were made as previously reported.³³ In brief, mice were injected subcutaneously with 3 mg of D-luciferin (Promega, WI, USA) in PBS and imaged 12 minutes later. Tumor growth was evaluated by measuring bioluminescence of THP-1 cell line transfected to express the luciferase reporter gene by using the bioluminescent IVIS imaging system (Xenogen-Caliper, Massachusetts, MA, USA). Mice were anesthetized using isoflurane (2.5% vaporized in O₂) during bioluminescence analyses. For analysis, total photon flux (photons per second) was measured from the whole animal using Aura imaging software.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

The Mann-Whitney test was used to compare flow-cytometry data and serum cytokine levels between two groups. Comparisons between GVHD score curves were made using the 2-way ANOVA test. Survival curves were modeled using the Kaplan-Meier method. Comparisons between groups were made with the log-rank test. Comparisons between cells in cultures were made with the 2-way ANOVA test and multiple comparisons with Sidak's or Tukey's multiple comparisons test. The Kruskal-Wallis test was used for Bioluminescence data. p values <0.05 were considered statistically significant and all p values were 2-sided. Statistical analyses were carried out with Graphpad Prism 8.3 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

ARTICLE OPEN



ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Autophagy degrades immunogenic endogenous retroelements induced by 5-azacytidine in acute myeloid leukemia

Nandita Noronha¹, Chantal Durette¹, Maxime Cahuzac¹, Bianca E Silva², Justine Courtois², Juliette Humeau¹, Allan Sauvat³, Marie-Pierre Hardy¹, Krystel Vincent¹, Jean-Philippe Laverdure¹, Joël Lanoix¹, Frédéric Baron², Pierre Thibault^{1,4}, Claude Perreault^{1,4} and Gregory Ehx^{1,2,4,5}

© The Author(s) 2024

The hypomethylating agent 5-azacytidine (AZA) is the first-line treatment for AML patients unfit for intensive chemotherapy. The effect of AZA results in part from T-cell cytotoxic responses against MHC-I-associated peptides (MAPs) deriving from hypermethylated genomic regions such as cancer-testis antigens (CTAs), or endogenous retroelements (EREs). However, evidence supporting higher ERE MAPs presentation after AZA treatment is lacking. Therefore, using proteogenomics, we examined the impact of AZA on the repertoire of MAPs and their source transcripts. AZA-treated AML upregulated both CTA and ERE transcripts, but only CTA MAPs were presented at greater levels. Upregulated ERE transcripts triggered innate immune responses against double-stranded RNAs but were degraded by autophagy, and not processed into MAPs. Autophagy resulted from the formation of protein aggregates caused by AZA-dependent inhibition of DNMT2. Autophagy inhibition had an additive effect with AZA on AML cell proliferation and survival, increased ERE levels, increased pro-inflammatory responses, and generated immunogenic tumor-specific ERE-derived MAPs. Finally, autophagy was associated with a lower abundance of CD8⁺ T-cell markers in AML patients expressing high levels of EREs. This work demonstrates that AZA-induced EREs are degraded by autophagy and shows that inhibiting autophagy can improve the immune recognition of AML blasts in treated patients.

Leukemia; <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02250-6>

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia in adults, with an overall 5-year survival below 30%. Standard therapy involves intensive chemotherapy with a '7 + 3' regimen of cytarabine and anthracycline. Although AML is a heterogeneous disease, aberrant genomic methylation (hypermethylation in particular [1, 2]) is a hallmark of AML blasts. Therefore, hypomethylating agents such as 5-azacytidine (azacytidine, AZA) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, DAC) are used as first-line therapy for AML patients unfit for intensive chemotherapy [3]. AZA is also used in maintenance therapy for fit patients without an *FLT3* mutation [3]. However, only 18–47% of patients respond to these therapies, stressing the need to improve therapy efficacy, possibly by combining them with other pharmacologic agents [4, 5].

AZA and DAC are cytidine nucleoside analogs that incorporate into genomic DNA during the mitosis [6]. High concentrations of AZA and DAC exert cytotoxic effects by inducing DNA double-strand breaks. However, at low concentrations, they act as suicide substrates for DNA methyltransferases (DNMTs) 1 and 3, leading to

their degradation and the DNA demethylation of daughter cells. AZA differs from DAC by its ability to incorporate into RNA and DNA, thus inhibiting DNMT2, a transfer RNA methyltransferase [7]. While both agents have similar response rates in AML [8], only AZA significantly improves overall survival compared with conventional care regimens in phase III randomized trials [9, 10]. Therefore, only AZA is currently FDA-approved as a first-line treatment in AML [11].

In addition to their cytotoxic and demethylating effects, hypomethylating agents may mediate anti-leukemic activities by sustaining the elimination of malignant blasts by effector T cells [12]. Specifically, hypomethylating agents enhance the expression of transcripts coding for cancer-testis antigens [13, 14]. Cancer-testis antigens genes are normally silenced by genomic methylation and code for antigens deemed immunogenic because they are not expressed in normal MHC-positive somatic cells [15]. Accordingly, some studies evidenced that hypomethylating agents promote CD8⁺ T-cell activity [16], while others demonstrate a specific cytotoxic activity against cancer-testis antigens [14, 17, 18]. These studies suggest that

¹IRIC Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. ²GIGA Institute, Laboratory of Hematology, University of Liege, Liege, Belgium. ³Equipe labellisée par la Ligue contre le Cancer, Université de Paris, Sorbonne Université, Inserm U1138, Institut Universitaire de France, Paris, France. ⁴These authors contributed equally: Pierre Thibault, Claude Perreault, Gregory Ehx. ⁵email: g.ehx@uliege.be

Received: 22 December 2022 Revised: 2 April 2024 Accepted: 8 April 2024
Published online: 16 April 2024

SPRINGER NATURE

hypomethylating agents-induced cancer-testis antigens can promote anti-leukemic CD8⁺ T-cell reactions by generating immunogenic MHC-I-associated peptides (MAPs).

Along with cancer-testis antigens, hypomethylating agents promote the expression of endogenous retroelements (EREs) [19, 20]. EREs are highly repetitive sequences that are remnants of transposable elements incorporated into the human genome [21]. They can be segregated into LINEs and SINEs (long and short interspersed elements, respectively) and LTRs (long terminal repeats), the latter of which includes endogenous retroviruses (ERVs). EREs are epigenetically silenced mainly by genomic methylation in normal somatic cells [22], and dysregulated ERE expression is associated with several pathologic conditions, including autoimmunity, and cancer [23]. Hypomethylating agents-induced ERE overexpression in solid cancers leads to viral mimicry and concomitant innate immune response against ERE-derived double-stranded RNAs [24, 25]. Moreover, we and others have demonstrated that in addition to being expressed, EREs can be presented by MHC-I molecules and serve as immunogenic tumor antigens, notably in AML [26–29]. While EREs are perfect candidates for generating immunogenic MAPs following hypomethylating agents treatment, there is a lack of robust evidence to support that hypomethylating agents enhance their MAP presentation (and subsequent CD8⁺ T-cell responses) in AML.

Apart from the documented induction of cancer-testis MAPs and the assumed induction of ERE MAPs, the other impacts of hypomethylating agents on the immunopeptidome are poorly understood. Therefore, we sought to validate the induction of ERE MAPs by the most widely used hypomethylating agent, AZA, and to investigate its global effects on the immunopeptidome directly. We discovered that AZA promotes the expression of multiple cancer-testis MAPs but not ERE MAPs. Mechanistically, we demonstrate that the immunopeptidome of AZA-treated cells is shaped by autophagy, which degrades ERE transcripts and reduces their capacity to generate MAPs.

MATERIAL AND METHODS

All methods are reported in supplemental data.

RESULTS

Low-dose AZA inhibits DNMT1 without inducing cell death

To investigate the effects of AZA on the immunopeptidome of AML, we selected four cell lines (THP-1, MOLM-13, SKM-1, and OCI-AML3) belonging to aggressive FAB types (M4/M5) and covering different but frequent mutational statuses (MLL-AF9, FLT3-ITD, TET2 (L1418fs), and NPM1c + DNMT3A (R882C), respectively). We aimed to focus on the hypomethylating effects of AZA (responsible for the induction of EREs). Therefore, we established a protocol enabling DNMT1 degradation and genomic demethylation without affecting viability or inducing DNA damage responses. AZA doses of 0.25 μM (for MOLM-13 and SKM-1) and 0.5 μM (for THP-1 and OCI-AML3) reduced cell growth, genome methylation, and DNMT1 expression without inducing cytotoxic effects (Fig. 1A and Fig. S1) and were chosen for further investigation.

Next, to maximize our chances of discovering ERE MAPs, we sought to identify a time point at which AZA induces an overexpression of ERE transcripts. Using THP-1 as a model, we performed RNA sequencing (RNA-seq) every 48 h from day 3 to 11 post-AZA discontinuation. We then quantified the expression of multiple ERE transcripts upregulated by AZA [25]. We also assessed the expression of genes involved in double-stranded RNA-induced interferon signaling in response to AZA-induced ERE expression [24] and observed that, together with ERE transcripts, they reached maximum expression around day 5 (72 h after the last AZA treatment; Fig. 1B). qPCR analyses further validated that the effect of AZA on ERE and double-stranded RNA-induced immune response genes was maximal on day 4 (48 h after the last AZA treatment; Fig. S2). Accordingly, we treated the four AML cell lines with these optimal AZA doses, administered three times at

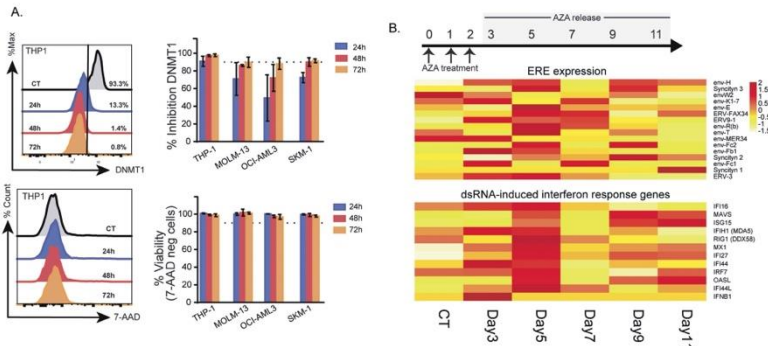


Fig. 1 Low-dose AZA treatment leads to delayed, transient ERE and double-stranded RNA-induced interferon gene expression in AML cell lines. **A** Low AZA doses were added to four AML cell lines daily for three days (0.25 μM; MOLM-13 and SKM-1; 0.5 μM; THP-1 and OCI-AML3) and DNMT1 inhibition (upper panel) and cell viability (lower panel) were monitored by flow cytometry using 7-AAD (lower panel). The dotted lines represent 90% DNMT1 inhibition/viability in the upper and lower panels. The left panels depict representative histograms of THP-1 cells, while the right panels depict bar plots summarizing the percentage of expression/staining (as indicated in figures) of all four AML cells. Percentages were calculated by comparing AZA-treated cells to the control cells (CT). **B** Low AZA doses (0.5 μM) were added to THP-1 cells daily for three days, after which AZA treatment was released by washing and expanding cells in the absence of AZA. Cells were collected for RNA-seq at the time points highlighted in grey. Heatmap comparing RNA expression levels of EREs induced by AZA (upper panel) and genes involved in double-stranded RNA (dsRNA)-induced viral response (lower panel) identified in previous studies [24, 25] of control (day 3) and AZA-released cells at the time points indicated.

24 h intervals (0 h, 24 h, and 48 h), and harvested the cells on day 4 to perform RNA-seq and mass spectrometry analyses, described in the next sections.

AZA enhances the presentation of cancer-testis MAPs but not of ERE MAPs

To identify peptides, mass spectrometry relies on reference protein databases (such as Uniprot) to match each acquired spectrum to a peptide sequence. However, public databases do not contain non-exonic sequences, preventing the analysis of MAPs deriving from non-conventional transcripts, such as EREs. Therefore, we built personalized databases containing the MAP sequences corresponding to the RNA transcripts expressed by our cell lines in RNA-seq analyses (Fig. 2A and Fig. S3A, see methods for details). These databases enabled the identification of MAPs deriving from any expressed genomic region (including EREs). Following mass spectrometry identifications, differential abundance analyses were performed on each cell line to characterize the impact of AZA on the immunopeptidome. In parallel, differential gene expression analyses were conducted on RNA-seq data to evaluate the effects of AZA on the expression of coding genes and the $\sim 4.2 \times 10^6$ EREs reported in Repeatmasker [30, 31].

Altogether, these analyses revealed that the number of elements differentially expressed by AZA-treated cells varies across cell lines, with THP-1 being the most sensitive (Fig. 2B and Table S1). Overall, the proportion of differentially expressed MAPs (DEMs) was five times greater than that of differentially expressed transcripts (DEGs): 6–23% vs. 1.9–4.69%, respectively. Notably, the number of DEMs per cell line correlated almost perfectly with the number of DEGs rather than the total number of MAPs per cell line, showing that transcriptomic alterations are reflected in the immunopeptidome (Fig. 2C). However, the directionality of differential expression differed for MAPs and transcripts. While most DEGs (>70%) were upregulated by AZA, this was not the case for DEMs (Fig. 2D, E, Table S2). This means that, as with other drugs [32], changes in the immunopeptidome post-AZA treatment result from differential mRNA expression and post-translational events.

Regarding EREs, 506 were consistently upregulated in a unique differential gene expression analysis for each cell line (Fig. S3B). Using ERE distribution in the genome as a reference, we found that AZA selectively upregulated two classes of EREs, LINEs and LTRs, while SINEs were poorly upregulated (Fig. S3C). This was consistent with the fact that repression of SINEs depends mainly on histone methylation rather than DNA methylation [33]. While EREs represented a large proportion of DEGs (~38%), they accounted for only 0.22% of upregulated DEMs, suggesting that AZA-induced ERE transcripts may not be processed adequately for MHC-I presentation (Fig. 2F, G and Table S3). Because of the delay between AZA treatment and ERE induction (Fig. 1B), we repeated our immunopeptidomic analyses at a later time point (day 7) on THP-1 (the cell line with the highest AZA-induced EREs). We did not observe a higher ERE MAP presentation than on day 4 (Fig. S4). Notably, on both day 4 and day 7, upregulated DEMs contained more cancer-testis MAPs than ERE MAPs (Fig. 2F, G and Fig. S4). Among the upregulated DEMs, 152 (~10%) were AZA-specific (i.e., presented by all three AZA-treated replicates but undetected in control cells; Fig. S5A). MAPs induced de novo by AZA contained cancer-testis antigens but not ERE MAPs (Fig. S5B). We conclude that at the immunopeptidomic level, AZA upregulates the expression of cancer-testis MAPs (some being AZA-specific) but not ERE MAPs.

AZA-induced EREs trigger innate immune responses

In cancer cells, innate immune responses benefit the host because they can initiate cancer cell apoptosis and increase their adjuvanticity [34]. Because our analyses showed that the effects

of AZA on EREs are much more conspicuous at the transcriptomic than at the immunopeptidomic level, we investigated whether AZA-induced ERE transcripts directly affect AML biology. We first performed a gene ontology (GO) analysis on the DEGs upregulated by AZA. This revealed that a large fraction of the identified pathways (~55%) were related to innate immune responses (Fig. 3A). Given that EREs can generate double-stranded RNAs recognized by anti-viral innate pathways, we examined the expression of multiple genes (OAS1, OAS2, OAS3, GBP1, and RIG-I) playing pivotal functions in such pathways. All of them were expressed at higher levels in AZA-treated cells (Fig. 3B). Accordingly, using microscopy, we observed greater amounts of double-stranded RNAs in AZA-treated cells (Fig. 3C). Altogether, these data show that the upregulation of ERE transcripts induced by AZA leads to double-stranded RNA formation, recognized by innate anti-viral immune responses.

Next, we evaluated whether AZA-induced EREs also trigger innate immune responses in AML patients. Using the RNA-seq data of the Leucegene cohort (437 patients), we quantified the expression of the 506 ERE transcripts (Table S3) upregulated by AZA in our cell lines. Patients were segregated based on their cumulative expression of these EREs, and those expressing above-median levels ($n=219$) were compared with those expressing below-median levels ($n=218$). As expected, DEGs and GO analyses revealed that high levels of AZA-induced EREs were associated with upregulated defense responses against viruses (Fig. S6A). Furthermore, ERE expression levels significantly correlated with the expression of two critical double-stranded RNA response regulators, RIG-I and MDA5 (Fig. S6B). This shows that AZA-induced ERE expression is also associated with innate immune responses *in vivo*.

To complement our previous analysis, we also performed GO analyses on genes downregulated by AML patients expressing high levels of AZA-induced EREs. This showed that multiple pathways controlling proliferation were downregulated, suggesting that high ERE expression (and anti-double-stranded RNA response) might impact the growth of AML blasts (Fig. S6C). Unexpectedly, we also observed that many GO terms related to protein degradation/catabolism and autophagy were significantly downregulated in these patients. Since ERE RNAs can trigger autophagy [35] and be degraded by the autophagic process [35, 36], we hypothesized that enhanced autophagy in low-ERE expressing blasts could protect them from the deleterious effects that EREs have on their proliferation. Therefore, we next investigated whether AZA-treated cells present significant alterations in their protein homeostasis.

AZA molds the immunopeptidome and induces protein aggregation through DNMT2 inhibition

The immunopeptidome is shaped by modifications in protein homeostasis [32] and by fluctuations in the abundance of transcripts [29, 37]. Therefore, we investigated whether immunopeptidomic changes in AZA-treated cells can be explained solely by variations in the transcriptome. Using BamQuery, a computational tool that quantifies the RNA expression of any MAP of interest [38], we observed that most AZA-altered DEMs displayed no change at the RNA level (Fig. 4A). Nevertheless, among DEMs coded by DEGs, RNA upregulation strongly correlated with concurrent upregulation of the corresponding DEMs (Fig. 4A). This was not the case for downregulated transcripts. Moreover, fold-changes in RNAs generating upregulated DEMs were significantly higher than those in downregulated DEMs (Fig. 4B). Altogether, these data show that RNA transcript upregulation does not fully explain DEM variations.

To gain insights into the protein homeostasis alterations affecting the immunopeptidome, we focused on DEMs whose source RNA fold-change did not explain their immunopeptidomic fold-change in the next sections. We started by analyzing their

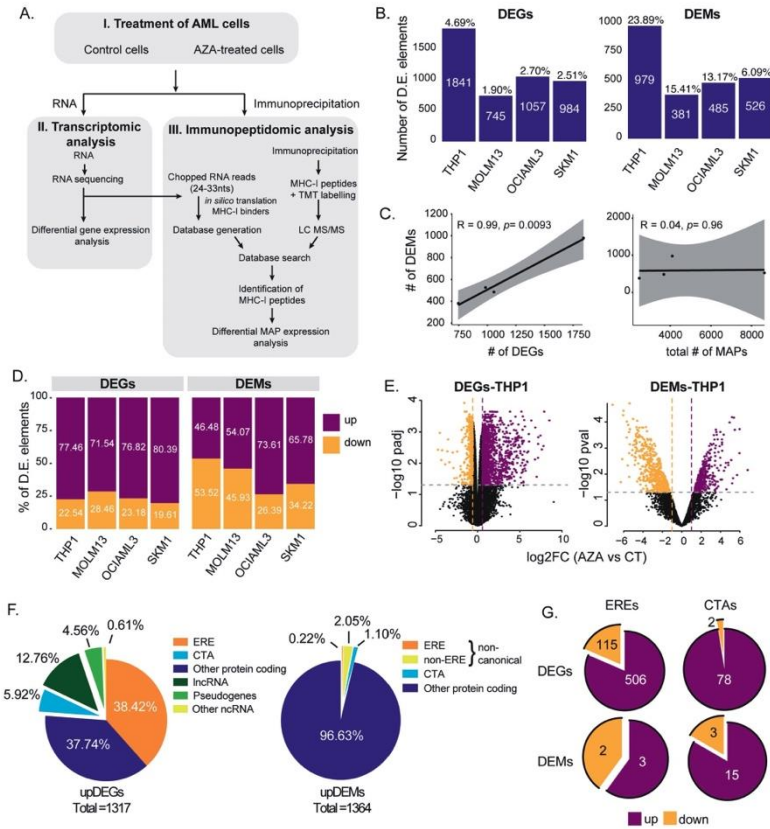


Fig. 2 Proteogenomic characterization of AZA-mediated changes shows upregulation of MAPs derived from cancer-testis antigens but not from EREs. THP-1, MOLM-13, SKM-1, and OCI-AML3 cells were treated for 72 h with 0.5 μ M of AZA (supplemented at 0, 24, and 48 h), washed, and maintained in fresh medium for 24 h before analysis. **A** Schematic representation of the study design for RNA-seq and mass spectrometry (MS) analyses. **B** The number of differentially expressed (D.E.) genes and MAPs (DEGs and DEMs, respectively) varies across cell lines. The numbers above the bars indicate the percentage of total genes or MAPs that were DEGs or DEMs, respectively. **C** Pearson correlation between the number of DEMs and DEGs (left panel) or DEMs and MAPs (right panel). Each dot corresponds to a cell line. **D** Percentage of D.E. elements up- or downregulated across cell lines. **E** Representative volcano plots of DEGs and DEMs between AZA (violet) and untreated (gold) THP-1 cells. **F** Pie charts depicting the percentage of biotypes of commonly upregulated transcripts (left) and MAPs (right) in all cell lines. The total number of upregulated D.E. elements is indicated below the pie charts. **G** Pie charts depicting the number of up- and downregulated EREs (left) and cancer-testis antigens (CTA, right) belonging to DEGs (upper panel) or DEMs (lower panel) fractions commonly regulated in all cell lines. lncRNA: long non-coding RNA, ncRNA: non-coding RNA.

residue composition. Upregulated peptides contained more polar residues and presented a lower hydrophobicity than downregulated ones (Fig. 4C, D). Interestingly, hydrophobic residues are the preferential cleavage sites of proteasomes, particularly

immunoproteasomes [39]. Furthermore, MAP generation by constitutive proteasomes depends mainly on their tryptic and chymotryptic-like activities, and chymotryptic-like activity is further amplified in immunoproteasomes [40, 41]. Hence, we

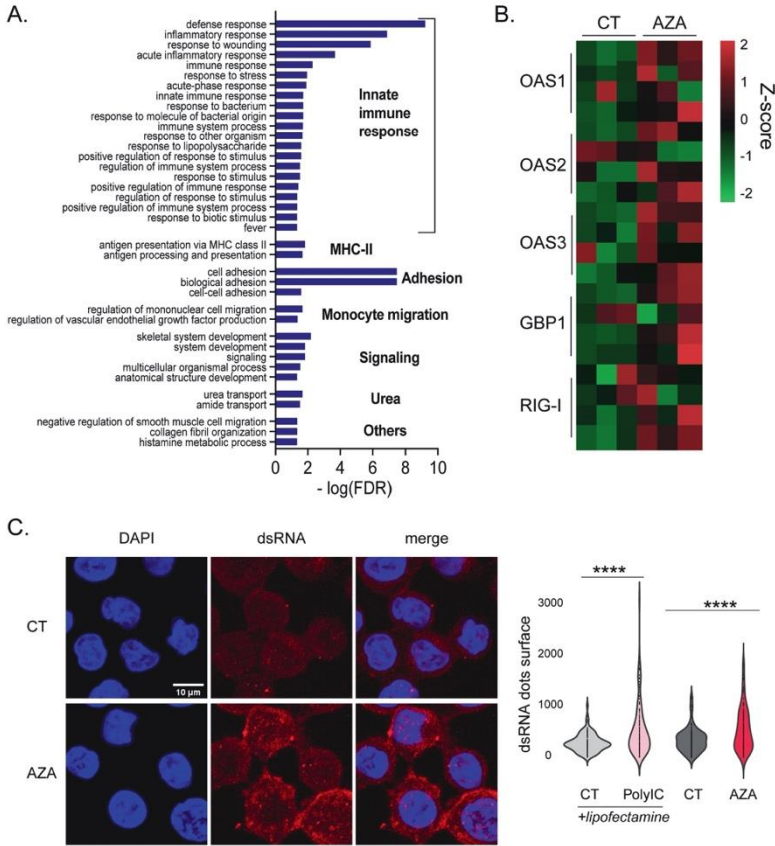


Fig. 3 AZA-induced EREs trigger innate immune responses. **A** Histogram depicting GO-term analysis of the most significantly enriched biological processes associated with upregulated DEGs across all cell lines after AZA treatment. **B** Heatmap of genes involved in anti-double-stranded RNA (dsRNA) responses commonly regulated in all cell lines. **C** Representative images (left) and quantification (right) of dsRNA signals in THP-1 cells from microscopy images (two independent experiments). THP-1 cells transfected with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polyinosinic:polycytidylic acid using lipofectamine (PolyIC+lipofectamine) were used as a positive control and were compared with cells treated with lipofectamine alone (CT+lipofectamine); (unpaired t-test, **** $p < 0.0001$).

assessed how protease activity contributed to the immunopeptidome by examining the C-terminal residue of each peptide. We observed that upregulated peptides resulted primarily from tryptic cleavage (Fig. 4E). Consistent with this, AZA treatment significantly reduced immunoproteasome activity (Fig. 4F, Fig. S7A).

Typically, alterations in proteasomal activity are associated with disrupted protein homeostasis [42, 43]. Therefore, we examined the residue composition of proteins that generated DEMs.

Assuming that proteins generating multiple peptides are degraded more actively than those generating a single one, we correlated the number of DEMs for each protein with its amino acid composition. This analysis showed that aspartic acid (Asp) and glycine (Gly) had the best positive correlation with the number of upregulated DEMs (Table S4). Interestingly, the transfer RNAs of Asp and Gly are stabilized by DNMT2, a transfer RNA-methyl transferase enzyme inhibited by AZA [44, 45]. A

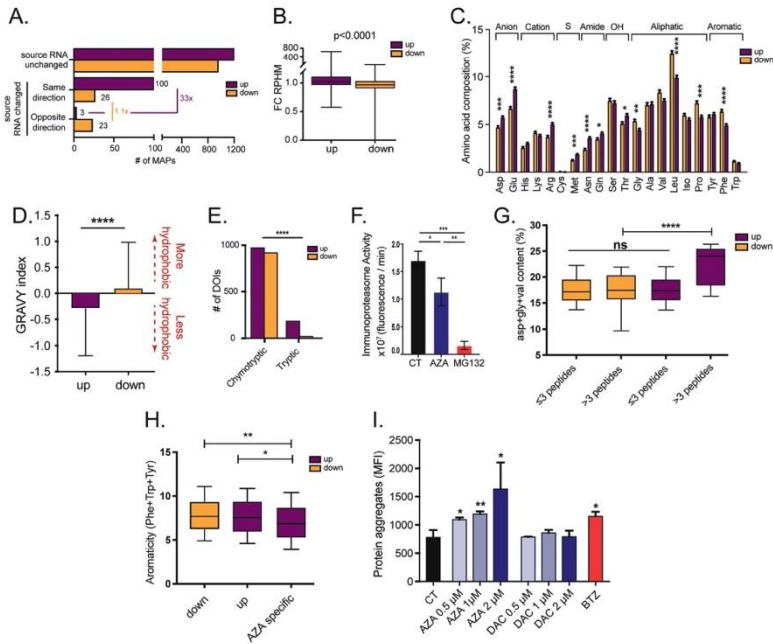


Fig. 4 AZA molds the immunopeptidome through DNMT2 inhibition. THP-1, MOLM-13, SKM-1, and OCI-AML3 cells were treated for 72 h with 0.5 μ M of AZA (supplemented at 0, 24, and 48 h), washed, and maintained in fresh medium for 24 h before analysis. **A** Bar plots depicting the number of up- and downregulated DEMs identified in all cell lines and variations in the expression of their source RNA. **B** Fold changes (FC) of reads per hundred million (rphm) expression of source transcripts generating up- and downregulated DEMs identified in all cell lines. **C** Amino-acid composition of up- and downregulated DEMs of interest identified in all cell lines. **D** Hydrophobicity of up- and downregulated DEMs of interest identified in all cell lines assessed by their GRAY index. Scores > 0 reflect higher hydrophobicity. **E** Number of DEMs of interest (DOIs) identified in all cell lines associated with chymotryptic or tryptic activities based on their C-terminal amino acid composition (Fisher's exact test). **F** Immunoproteasome activity in OCI-AML3 cells after 0.5 μ M AZA treatment for 24 h. MG132 (100 μ M), a proteasome inhibitor, was used as a negative control (unpaired *t*-test). **G** Proportion of DNMT2-target amino acids (glycine (gly), valine (val), and aspartic acid (asp)) in proteins having generated MAPs among the up- or downregulated DEM fractions identified in all cell lines. **H** Aromaticity (frequency of phenylamine (Phe), tryptophan (Trp), and tyrosine (Tyr) residues) of proteins having generated AZA-specific (identified only in AZA condition) MAPs or up- and downregulated DEMs identified in all cell lines. **I** Quantification of protein aggregates induced with increasing concentrations of AZA and DAC in OCI-AML3 cells after 24 h. Bortezomib (BTZ, 10 nM) was used as a positive control (unpaired *t*-test; *****p* < 0.0001, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05).

comparison of the frequency of Asp, Gly, and valine (Val, the third amino acid whose transfer RNA is methylated by DNMT2) revealed that proteins generating more than three upregulated DEMs present significantly higher cumulative frequencies of Asp, Gly, and Val (Fig. 4G). Demethylated transfer RNAs are susceptible to ribonuclease cleavage and fragmentation [45]. Therefore, we hypothesized that AZA-mediated DNMT2 inhibition results in an insufficiency of Asp, Gly, and Val transfer RNAs and leads to a decrease in protein synthesis, ribosomal stalling, and consequent protein aggregate generation during translation of proteins rich in the aforementioned residues. Accordingly, AZA-specific peptides were generated from proteins with a significantly lower proportion of aromatic residues, a feature often associated with less

efficient protein folding (Fig. 4H) [46]. Furthermore, we experimentally observed that AZA induces protein aggregates in a dose-dependent manner (Fig. 4I and Fig. S7C), and that DAC, which inhibits DNMT1 but not DNMT2, did not induce protein aggregates. Finally, siRNA knock-down of DNMT2 increased protein aggregation levels, in agreement with previous studies (Fig. S7B) [47]. Altogether, these results show that the immunopeptidome of AZA-treated cells is significantly impacted by the DNMT2 inhibition mediated by AZA.

Autophagy degrades AZA-induced EREs

Given the inverse correlation between autophagy-related GO terms and EREs in AML patients and the generation of protein

aggregates by AZA, we evaluated whether AZA induces autophagy. Twenty-four hours of treatment resulted in a dose-dependent induction of autophagy, assessed by an autophagy detection kit, in all AML cell lines (Fig. 5A and Fig. S8A). This agreed with previous reports [48–50] and was confirmed by western blot analysis of LC3-II (Fig. S8B). Interestingly, this autophagy induction was mainly absent with DAC, showing that autophagy induction depends on protein aggregates generation

resulting from DNMT2 inhibition. As EREs were previously shown to trigger autophagy [35], we evaluated whether DAC induced the same EREs as AZA. Therefore, we treated THP-1 cells with a DAC dose (30 nM) that inhibited DNMT1 (Fig. S8C, D) without inducing cell death at 96 h, and observed that DAC upregulated the expression of the same EREs induced by AZA (Fig. 5B). This upregulation was concomitant with an induction of innate immune responses, evidenced by GO-term analysis (Fig. 5C and

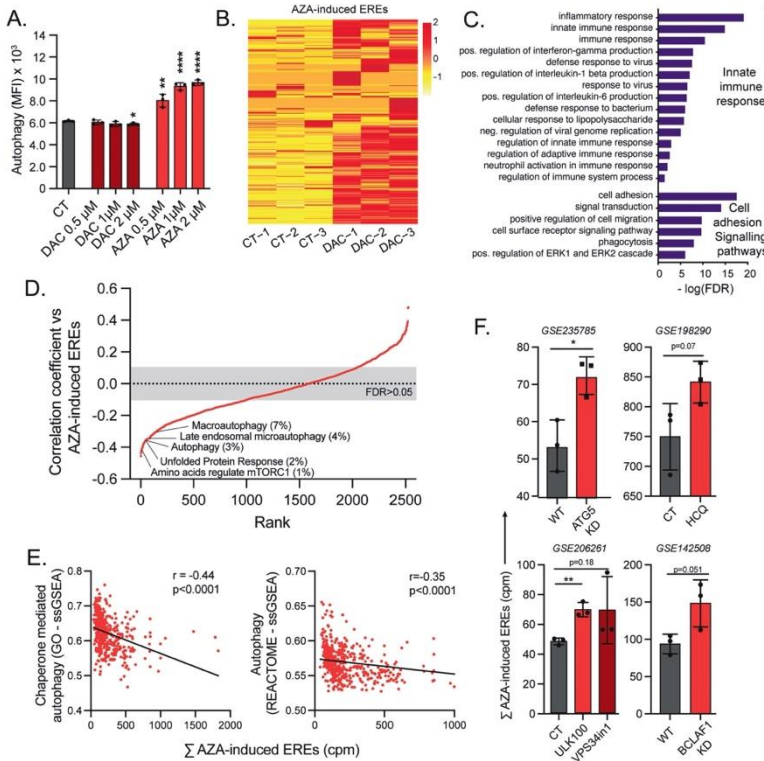


Fig. 5 Autophagy degrades AZA-induced EREs. A THP-1 cells undergoing autophagy were assessed with increasing doses of AZA and DAC by flow cytometry for 24 h using specific autophagy detection fluorescent probes. **B** EREs commonly induced by AZA in our cell lines were quantified in RNA-seq data of DAC-treated THP-1 cells. **C** Histogram depicting GO-term analysis of the most significantly enriched biological processes associated with upregulated DEGs in THP-1 cells post-DAC treatment. **D** The expression of all REACTOME gene sets was determined in all patients of the Leucegene cohort by ssGSEA. Each of these gene sets was then correlated (Spearman) with the summed expression of the EREs induced by AZA in our cell lines. Gene sets were ranked in function of the correlation coefficients, and ranks were plotted vs the correlation coefficients. Some gene sets among the top 10% of ranks are highlighted. **E** Manual correlation between the indicated gene sets and the summed expression in counts per million (cpm) of the EREs found to be induced by AZA in our cell lines using single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA). **F** Sum of the expression of the EREs found to be induced by AZA in our cell lines in indicated samples from the indicated RNA-seq experiments obtained from GEO (GSE identifications). KD=knock-down; HCQ=Hydroxychloroquine (autophagy inhibitor); ULK100 and VPS34in1 are autophagy inhibitors.

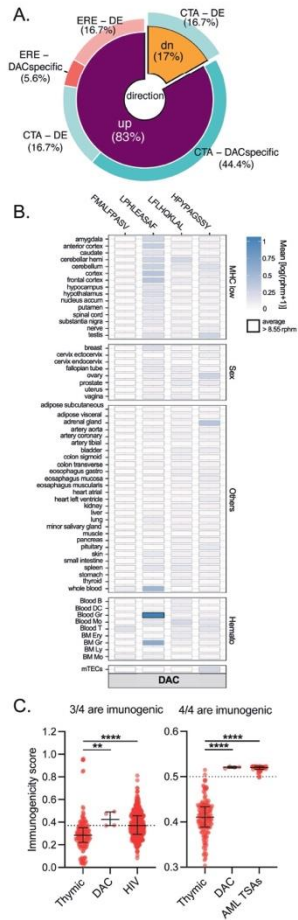


Fig. 6 DAC induces immunogenic ERE MAPs. **A** Repartition of cancer-testis antigens (CTA) and ERE MAPs significantly altered by DAC in THP-1 cells. DE: differentially expressed, DAC-specific: MAPs present in all three replicates of DAC and absent in CT. **B** Heatmap of average RNA expression of MAPs upregulated by DAC in normal tissues from GTEx ($n = 12-50$), normal hematopoietic cell populations ($n = 3-16$), or mTECs ($n = 11$). Boxes in which a MAP has an $rphm > 8.55$ are highlighted in black. **C** Comparison of immunogenicity scores (Repitope, left and BamQuery, right) among MAPs upregulated by DAC-treated THP-1 cells, MAPs from thymic stromal cells, AML tumor specific antigens (AML TSAs) and HIV MAPs. Thymic MAPs are negative control since they are not expected to be immunogenic, while AML TSAs and HIV MAPs are positive controls. Treatments refer to three days of daily $0.5 \mu\text{M}$ AZA or 30 nM DAC followed by 24-h discontinuation unless otherwise stated.

on correlation coefficients evidenced that multiple gene sets related to autophagy and unfolded protein response were inversely correlated and among the top 10% of ranked gene sets, showing their importance in regulating ERE levels (Fig. 5D). Targeted correlations with gene sets from other sources and genes playing crucial roles in autophagy also showed similar results (Fig. 5E and 58E). This indicates that, at the time of diagnosis, AML cells with higher basal autophagic activity are associated with low ERE levels, and vice versa. Additionally, we downloaded data from previously published studies performing autophagy inhibitions [51, 52] and observed that autophagy inhibition, whether genetic or chemical, resulted systematically in the upregulation of EREs (Fig. 5F). Altogether, these results demonstrate that autophagy degrades ERE transcripts independently of AZA treatment.

Finally, we tested whether autophagy induction would prevent the generation of MAPs by ERE transcripts. We, therefore, performed immunopeptidomic analyses on THP-1 cells treated with DAC. This revealed that in addition to cancer-testis MAPs, DAC upregulated the presentation of 4 ERE MAPs (Fig. 6A and Table S6), while none were downregulated. To estimate whether these MAPs could be recognized by CD8^+ T cells, we queried their RNA expression in 50 normal human tissues from GTEx, in hematopoietic cells, and mTECs with BamQuery (Fig. 6B). Three out of four ERE MAPs were lowly or not expressed, suggesting the absence of central tolerance for these peptides [15, 38, 53]. Immunogenicity predictions with two machine learning algorithms (Repitope [54] and BamQuery [38]) further supported the immunogenicity of these MAPs (Fig. 6C). In summary, these data show that autophagy degrades ERE transcripts and hampers their MAP generation capacity.

Autophagy inhibition has additive effects with AZA and increases AML immunogenicity

Finally, we examined whether inhibiting autophagy would augment the anti-AML effect of AZA. THP-1 and OCI-AML3 cells were treated for three days with AZA and/or Spautin-1 (which inhibits autophagy and suppresses the unfolded protein response, the most likely process involved in autophagy induction in response to protein aggregates [53, 55]), and their survival and cell counts were evaluated. An additive effect between AZA and Spautin-1 was observed for both assays (Fig. 7A and Fig. 59A). While Spautin-1 alone reduced proliferation, it did not kill the cells (Fig. 59B, C), showing that autophagy is a survival mechanism upon AZA treatment. Similar results were obtained with another autophagy inhibitor, the VPS34 inhibitor SAR405 (Fig. 510).

Next, we investigated the effects of combined autophagy inhibition and AZA treatment on ERE-related responses. First, we either induced (with Rapamycin) or inhibited (with Spautin-1) autophagy in combination with AZA and measured double-

Table S5). This shows that the autophagy induced in AZA-treated (but not in DAC-treated) cells results from DNMT2 inhibition rather than ERE induction.

To further demonstrate that autophagy has a deleterious effect on ERE transcript levels, we performed a ssGSEA quantification of all REACTOME gene sets ($n = 2528$) in the Leucegene cohort (diagnosis samples). Next, we correlated each gene set with the expression of AZA-regulated EREs. A ranking of gene sets based

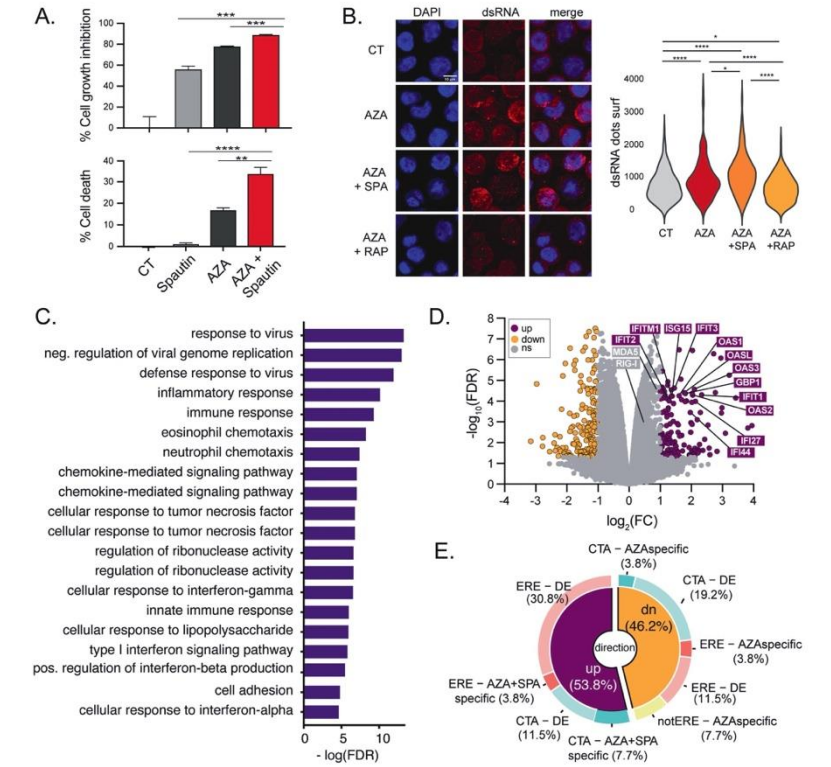


Fig. 7 Autophagy inhibition synergizes with AZA by further increasing ERE expression. **A** Cell growth inhibition and cell death (7-AAD) of THP-1 cells treated either with AZA (1 μM), spautin-1 (5 μM), or both for four days. Control cells were treated with 0.1% DMSO in two independent experiments (unpaired t-test; *****p* < 0.0001, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01). **B** Representative immunofluorescence images and quantification of double-stranded RNA (dsRNA) signals measured from microscopy images of THP-1 cells treated for four days with either Spautin-1, Rapamycin, or DMSO in the presence of 0.5 μM AZA (three days of daily AZA treatment followed by 24 h discontinuation). CT: 0.1% DMSO; AZA + SPA: AZA and 5 μM Spautin-1; AZA + RAP: AZA and 0.5 μM Rapamycin (unpaired t-test; **p* < 0.05, *****p* < 0.0001). **C** Histogram depicting GO-term analysis of the most significantly enriched biological processes associated with upregulated DEGs in THP-1 cells co-treated with AZA and Spautin-1. **D** Volcano plot of the differential gene expression analysis comparing THP-1 cells treated with AZA and AZA + Spautin-1 vs AZA only. Purple dots show genes upregulated (log₂(fold-change, FC) > 1; FDR < 0.05) in AZA + Spautin-1 cells. MDA5 and RIG-I were significantly upregulated (FDR < 0.05) but below our cutoff threshold (log₂(FC) > 1). **E** Distribution of cancer-testis antigens (CTA), ERE, and other non-canonical MAPs significantly altered by AZA and Spautin-1 vs. AZA alone. DE: differentially expressed, AZA+SPA specific; MAPs present in all three replicates of the combination and absent in AZA only condition, AZAspecific; MAPs present in all three replicates of the AZA only condition and absent in combination.

stranded RNAs with microscopy. As expected, Rapamycin decreased while Spautin-1 increased their levels (Fig. 7B). Next, we sought to perform immunopeptidomic analyses to evaluate the effects of AZA+Spautin-1 co-treatment. Therefore, we determined a co-treatment regimen through which autophagy and DNMT1 are inhibited and the viability of the cells is maintained (See Methods and Fig. S11A, B). RNA-seq analyses

confirmed that combining AZA and Spautin-1 induced greater levels of EREs compared to AZA alone (Fig. S11C). This increase was accompanied by an induction of anti-viral innate immune responses, notably illustrated by a significant upregulation of OAS and IFN-induced genes and GO-terms analysis (Fig. 7C, D and Table S7). This shows that autophagy inhibition can increase the expression of ERE transcripts, triggering innate immune responses.

Next, we investigated whether autophagy inhibition could restore the generation of ERE MAPs after AZA treatment. Immunopeptidomic analyses of THP-1 cells treated with AZA alone or combined with Spautin-1 showed that the combination upregulated nine ERE MAPs, while four were downregulated (Fig. 7E). With 828 upregulated MAPs and 904 downregulated ones, this represented a ~2.5-fold increase in the proportion of ERE MAPs among the immunopeptidome (1.08% vs 0.44%, Table S8). This upregulation was noteworthy because our original experiments did not detect a single upregulated ERE-derived MAPs in AZA-treated THP-1 cells. Notably, five out of nine ERE MAPs induced by the combination were lowly expressed in normal tissues (vs two out of four downregulated ones) (Fig. 8A). Immunogenicity prediction tools showed that upregulated ERE MAPs are more immunogenic than downregulated ones (Fig. 8B). Indeed, four out of nine (with Reptide) and six out of nine (with BamQuery) ERE MAPs upregulated by AZA+Spautin-1-treated cells were above immunogenicity thresholds, while none (Reptide) and two out of four (BamQuery) downregulated ones were above thresholds. These data show that autophagy inhibition promotes AZA's generation of immunogenic ERE MAPs.

Since autophagy inhibition increases immunogenic ERE MAPs, we reasoned that leukemic blasts with elevated autophagy might be less recognized by CD8⁺ T cells. To assess this, we segregated the Leucegene AML patients based on two parameters. The first was the expression of CD8A and CD8B transcripts, reliable markers of CD8⁺ T-cell abundance in RNA-seq [56]. The second was the count of highly expressed AZA-induced EREs (HE-EREs), i.e., the number of

EREs whose expression is above their median RNA expression across all patients having a non-null expression of the given ERE (a metric aimed at reflecting the density and diversity of epitopes presented by leukemic blasts [29]) (Fig. S11D). A GSEA comparing CD8^{high} vs. CD8^{low} patients within ERE^{high} and ERE^{low} groups revealed that the presence of CD8⁺ T cells was associated with the same processes in ERE^{high} and ERE^{low} patients, except for two gene sets related to DNA repair/proliferation, three related to metabolism, and two related to unfolded protein response and mTORC1 signaling (Fig. S11E). As mTORC1 regulates autophagy, we performed additional GSEAs with four gene sets related to autophagy from the REACTOME database. We found that all four were inversely associated with the presence of CD8⁺ T cells in ERE^{high} patients (two significantly), while the opposite was found for ERE^{low} patients (Fig. 8C). Altogether, these results further support that autophagy prevents the generation of ERE-derived MAPs, thereby precluding AML blasts from being recognized by CD8⁺ T cells.

DISCUSSION

Due to their capacity to trigger innate immune responses and generate immunogenic MAPs [30], EREs represent attractive targets for developing new immunotherapeutic avenues [26, 29, 57, 58]. Although AZA has been proposed to promote anti-tumor CD8⁺ T-cell responses through the induction of cancer-testis antigens, the contribution of ERE MAPs to such responses remains elusive. Aiming to unravel this contribution, we performed a thorough proteogenomic investigation to uncover

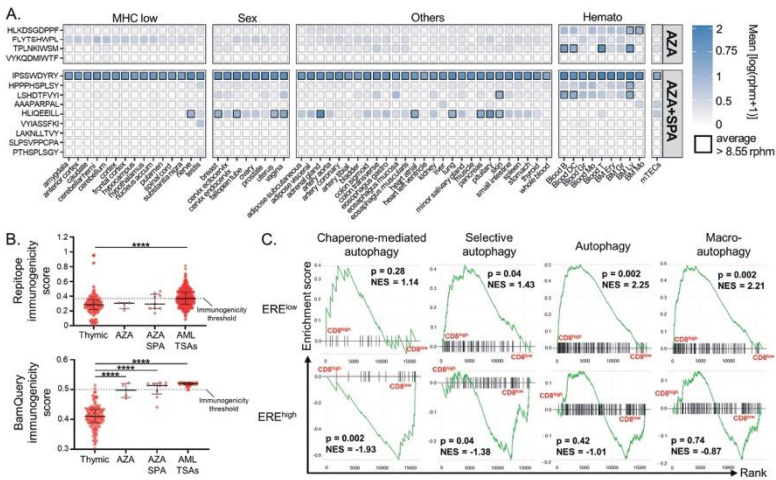


Fig. 8 Autophagy inhibition promotes AZA's generation of immunogenic ERE MAPs. **A** Heatmap of average RNA expression of MAPs downregulated (four on top) or upregulated (nine on bottom) after AZA+Spautin-1 vs AZA only treatment in normal tissues from GTEx ($n = 12-50$), normal hematopoietic cell populations ($n = 3-16$), or mTECs ($n = 11$). Boxes in which a MAP has an rpm > 8.55 are highlighted in black. **B** Comparison of immunogenicity scores (Reptide and BamQuery) among MAPs downregulated (four on top in panel A) or upregulated (nine on bottom in panel A) after AZA+Spautin-1 vs AZA-only treatment, MAPs from thymic stromal cells, AML tumor specific antigens (AML TSAs) and HIV MAPs. Thymic MAPs are negative control since they are not expected to be immunogenic, while AML TSAs and HIV MAPs are positive controls. **C** GSEA of the indicated REACTOME gene sets in the indicated comparisons. ERE^{high} and ERE^{low}: AML specimens expressing high and low levels of ERE respectively, NES = normalized enrichment score. AZA and Spautin-1 co-treatment experiments refer to treatment with Spautin-1 (5 μ M) or DMSO (0.1%) for 24 h followed by 0.5 μ M AZA for three days followed by 48 h discontinuation.

changes in the MAP repertoire after AZA treatment. As expected, we identified cancer-testis antigens upregulated at the transcriptomic and immunopeptidomic levels. In contrast, ERE MAP abundance remained unchanged after AZA treatment in the four cell lines examined. This suggests that T-cell-mediated responses post-AZA treatment are more likely due to the recognition of cancer-testis MAPs than EREs. A recent report analyzing the CD8⁺ T-cell subsets targeting ERE-derived MAPs revealed no increase in ERE-reactive T cell posts-AZA treatment in myeloid hematological malignancies, further supporting our observations [59].

The virtual absence of ERE MAP induction by AZA was paradoxical. Indeed, AZA strongly induced ERE transcripts, and the processing of numerous EREs should generate MAPs [30]. In AML patients, the basal ERE expression was positively associated with the expression of molecules involved in double-stranded RNA detection and anti-viral immune responses. In a previous report, high ERE expression in primary AML cells was associated with a favorable prognosis [60]. In addition, the clinical responses to AZA in myelodysplastic syndrome and AML is associated with the expression of a specific class of EREs inducing innate immune responses [61]. Therefore, elevated ERE expression certainly benefits patients' outcomes by inducing anti-double-stranded RNA immune responses, and maximizing these responses should be pursued.

Notably, we observed that ERE levels (and associated innate immune responses) were inversely correlated to the expression of autophagy molecules in AML patients, and enhanced autophagy was found in our AZA-treated cells. Upon examination of the immunopeptidomic changes, we could attribute this latter observation to AZA's inhibition of DNMT2 activity. Indeed, previous studies have shown that transfer RNA methylation by DNMT2 is involved in Asp-transfer RNA codon fidelity, and its loss leads to the production of misfolded proteins [62]. Autophagy is increasingly implicated in resistance to anti-cancer therapies, including resistance to AZA [48]. Here, abrogating autophagy by combining AZA with Spautin-1 or using DAC (which did not induce autophagy) showed an increase in both ERE transcripts and MAPs. Accordingly, an article also exploring the immunopeptidomic effects of DAC in glioblastoma cell lines evidenced an induction of ERE MAPs [63]. Thus, we conclude that the autophagic process triggered by DNMT2 inhibition hampers the proper induction of the presentation of ERE MAPs after AZA treatment.

While little is known about the interplay between EREs (remnants of ancient viruses) and autophagy, it is well-reported that autophagy is a defense response against viruses. Following infection, autophagy is triggered by the signaling of pattern-recognition receptors (such as RIG-like receptors) [64] to sustain the presentation of intracellular source proteins by MHC-II molecules [65]. Thereby, autophagy inhibition reduces the presentation of viral peptides to CD4⁺ T cells [66, 67]. In contrast, autophagy inhibition tends to increase MHC-I expression and the capacity to induce antiviral CD8⁺ T cell responses [68, 69]. Furthermore, autophagy can limit RIG-I-dependent IFN production by disrupting its signaling cascade [70, 71]. While these studies point to a potential negative correlation between autophagy and MHC-I presentation, they do not provide a precise molecular mechanism explaining how AZA-induced autophagy could prevent the generation of ERE MAPs. While this question will need to be explored in future studies, we surmise that autophagy degrades ERE RNAs instead of degrading their translational product. Indeed, autophagy has been reported to target viral [72] and ERE [35, 36] double-stranded RNAs to autophagosomes. Notably, this would explain why cancer-testis MAPs (which do not result from double-stranded RNAs) were successfully presented at higher levels after AZA treatment.

In conclusion, our results demonstrate that AZA-induced autophagy mitigates the ERE-dependent immune effects of AZA.

Moreover, our results show that autophagy inhibition could be a desirable therapeutic option to combine with AZA. Adding autophagy inhibitors to AZA would have three desirable consequences: (1) to increase the direct cytotoxicity of AZA by preventing AML adaptation to proteotoxic stress (in agreement with results from [50]), (2) to increase ERE transcripts abundance and the subsequent beneficial innate immune responses and (3) to improve ERE MAP presentation and thereby adaptive T-cell responses. Furthermore, some of these ERE MAPs are predicted to be immunogenic, making them attractive tumor vaccine candidates, and further investigations should be pursued in this direction.

DATA AVAILABILITY

The accession number for the RNA sequencing and expression data reported in this paper is GEO:GSE217572 and GSE248580. MS raw data and associated databases are deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the following dataset identifiers: PXD038663 and PXD046853. The code necessary for the generation of MS databases has been deposited on Zenodo <https://doi.org/10.5281/zenodo.7096388>. The remaining datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- Schoofs T, Berdel WE, Müller-Tidow C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014;28:1–14.
- Kroeger H, Jelinek J, Estéico MR, He R, Kondo K, Chung W, et al. Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood*. 2008;112:1366–73.
- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140:1345–77.
- Šimončíková K, Jančíková L, Kavcová H, Sulová Z, Breier A, Messingerová L. Different mechanisms of drug resistance to hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Drug Resist Updat*. 2022;61:100805.
- DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383:617–29.
- Jasielec J, Saloura V, Godley LA. The mechanistic role of DNA methylation in myeloid leukemogenesis. *Leukemia*. 2014;28:1765–73.
- Schaefer M, Hagemann S, Hanna K, Lyko F. Azacitidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2009;69:8127–32.
- Ma J, Ge Z. Comparison between decitabine and azacitidine for patients with acute myeloid leukemia and higher-risk myelodysplastic syndrome: a systematic review and network meta-analysis. *Front Pharm*. 2021;12:701690.
- Kantantjan HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30:2670–7.
- Fenaux P, Muftić GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10:223–32.
- Malik P, Cashen AF. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *Cancer Manag Res*. 2014;6:53–61.
- Ehx G, Fransolet G, de Leval L, DHondt S, Lucas S, Hannon M, et al. Azacitidine prevents experimental xenogeneic graft-versus-host disease without abrogating graft-versus-leukemia effects. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1314425.
- Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, James SR, Collamat-Lai G, Bagitko-Dorfs N, et al. Induction of cancer testis antigen expression in circulating acute myeloid leukemia blasts following hypomethylating agent monotherapy. *Oncotarget*. 2016;7:12840–56.
- Matsushita M, Otsuka Y, Tsutsumida N, Tanaka C, Uchiyama A, Ozawa K, et al. Identification of novel HLA-A*24:02-restricted epitope derived from a homeobox protein expressed in hematological malignancies. *PLoS ONE*. 2016;11:e0146371.
- Ehx G, Perreault C. Discovery and characterization of actionable tumor antigens. *Genome Med*. 2019;11:29.
- Luo N, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Sanchez V, Opalenik SR, Li H, et al. DNA methyltransferase inhibition upregulates MHC1 to potentiate cytotoxic T lymphocyte responses in breast cancer. *Nat Commun*. 2018;9:248.

17. Gang AO, Frosig TM, Brimmes MK, Lyngaa R, Treppendahl MB, Gronbaek K, et al. 5-Azacytidine treatment sensitizes tumor cells to T-cell mediated cytotoxicity and modulates NK cells in patients with myeloid malignancies. *Blood Cancer J*. 2014;4:e197.
18. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2012;119:3361-9.
19. Nahas MR, Stropopinsky D, Rosenblatt J, Cole L, Pyzer AR, Anastasiadou E, et al. Hypomethylating agent alters the immune microenvironment in acute myeloid leukemia (AML) and enhances the immunogenicity of a dendritic cell/AML vaccine. *Br J Haematol*. 2019;185:679-90.
20. Stone ML, Chiappinelli KB, Li H, Murphy LM, Travers ME, Topper MJ, et al. Epigenetic therapy activates type I interferon signaling in murine ovarian cancer to reduce immunosuppression and tumor burden. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:E10981-e10990.
21. Dewannieux M, Heidmann T. Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. *Curr Opin Virol*. 2013;3:646-56.
22. Schulz WW, Steinhoff C, Flor AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;310:211-50.
23. Payer LM, Burns KH. Transposable elements in human genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2019;20:760-72.
24. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell*. 2015;162:974-86.
25. Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell*. 2015;162:961-73.
26. Laumont CM, Vincent K, Hesnard L, Audemard E, Bonnell E, Laverdure JP, et al. Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci Transl Med*. 2018;10:aaau5516.
27. Smith CC, Beckermann KE, Bortone DS, De Cubas AA, Bixby LM, Lee SJ, et al. Endogenous retroviral signatures predict immunotherapy response in clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2018;128:4804-20.
28. Mullins CS, Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61:1093-1100.
29. Ehx G, Larouche JD, Durette C, Laverdure JP, Hesnard L, Vincent K, et al. Atypical acute myeloid leukemia-specific transcripts generate shared and immunogenic MHC class I-associated epitopes. *Immunity*. 2021;54:737-747.
30. Larouche JD, Trofimov A, Hesnard L, Ehx G, Zhao Q, Vincent K, et al. Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med*. 2020;12:40.
31. Noronha N, Ehx G, Meunier MC, Laverdure JP, Thériault C, Perreault C. Major multilevel molecular divergence between THP-1 cells from different biorepositories. *Int J Cancer*. 2020;147:2000-6.
32. Caron E, Vincent K, Fortier MH, Laverdure JP, Brameouille A, Hardy MP, et al. The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol*. 2011;7:533.
33. Varshney D, Vavrova-Anderson J, Oler AJ, Cowling VH, Cairns BR, White RJ. SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nat Commun*. 2015;6:6569.
34. Bloy N, Garcia P, Laumont CM, Pitt JM, Stigtu A, Stoll G, et al. Immunogenic stress and death of cancer cells: Contribution of antigenicity vs adjuvanticity to immunosurveillance. *Immunol Rev*. 2017;280:165-74.
35. Paget M, Cadena C, Ahmad S, Wang HT, Jordan TX, Kim E, et al. Stress granules are shock absorbers that prevent excessive innate immune responses to dsRNA. *Mol Cell*. 2023;83:1180-1196.e1188.
36. Guo H, Chitiprolu M, Gagnon D, Meng L, Perez-Iratxeta C, Lagace D, et al. Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat Commun*. 2014;5:5276.
37. Pearson H, Dasuda T, Granados DP, Durette C, Bonnell E, Courcelles M, et al. MHC class I-associated peptides derive from selective regions of the human genome. *J Clin Invest*. 2016;126:4650-701.
38. Cuevas MVR, Hardy MP, Larouche JD, Apavaloaei A, Kina E, Vincent K, et al. BamQuery: a proteogenomic tool to explore the immunopeptidome and prioritize actionable tumor antigens. *Genome Biol*. 2023;24:188.
39. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*. 1993;365:264-7.
40. Mishto M, Liepe J, Textoris-Taube K, Keller C, Henklein P, Webernuff M, et al. Proteasome isoforms exhibit only quantitative differences in cleavage and epitope generation. *Eur J Immunol*. 2014;44:3508-21.
41. Javitt A, Bamea E, Kramer MP, Wolf-Ley H, Levin Y, Admon A, et al. Pro-inflammatory cytokines alter the immunopeptidome landscape by modulation of HLA-B expression. *Front Immunol*. 2019;10:141.
42. Li J, Hochstrasser M. Microautophagy regulates proteasome homeostasis. *Curr Genet*. 2020;66:683-7.
43. Li Y, Li S, Wu H. Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells*. 2022;11:851.
44. Goll MG, Kirkekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, et al. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*. 2006;311:1395-8.
45. Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusbürger M, Helm M, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev*. 2010;24:1590-5.
46. Eilers M, Shekar SC, Shieh T, Smith SO, Fleming PJ. Internal packing of helical membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:5796-801.
47. Adamczyk-Grochala J, Bloniaz D, Zielinska K, Lewinska A, Wnuk M. DNMT2/TRDMT1 gene knockout compromises doxorubicin-induced unfolded protein response and sensitizes cancer cells to ER stress-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2023;28:166-85. Feb.
48. Romano A, Giallongo C, La Cava P, Parinello NL, Chiechi A, Vetro C, et al. Proteomic analysis reveals autophagy as pro-survival pathway elicited by long-term exposure with 5-azacytidine in high-risk myeloid dysplasia. *Front Pharm*. 2017;8:204.
49. Filip K, Lewinski A, Adamczyk-Grochala J, Marino Gammazza A, Cappello F, Lauricella M, et al. 5-azacytidine inhibits the activation of senescence program and promotes cytosolic autophagy during Trdmt1-mediated oxidative stress response in insulinoma β -TC-6 Cells. *Cells*. 2022;11:1213.
50. Nawrocki ST, Han Y, Visconte V, Prychodzen B, Espitia CM, Phillips J, et al. The novel autophagy inhibitor ROC-325 augments the antileukemic activity of azacitidine. *Leukemia*. 2019;33:2971-4.
51. Nivot P, Mathivet T, Wu J, Salemkour Y, Sankar DS, Baudrie V, et al. Autophagy protein 5 controls flow-dependent endothelial functions. *Cell Mol Life Sci*. 2023;80:210.
52. Sung K, Kurowski A, Lansiquot C, Wan KK, Patnaik S, Walsh MJ, et al. Selective inhibitors of autophagy reveal new link between the cell cycle and autophagy and lead to discovery of novel synergistic drug combinations. *ACS Chem Biol*. 2022;17:3290-7.
53. Yan MM, Ni JD, Song D, Ding M, Huang J. Interplay between unfolded protein response and autophagy promotes tumor drug resistance. *Oncol Lett*. 2015;10:1959-69.
54. Ogishi M, Yotsuyanagi H. Quantitative prediction of the landscape of T cell epitope immunogenicity in sequence space. *Front Immunol*. 2019;10:827.
55. Kunisaka K, Ikeda-Ishikawa C, Tani Y, Tsukahara S, Sakurai J, Okamoto Y, et al. Spautin-1 inhibits mitochondrial complex I and leads to suppression of the unfolded protein response and cell survival during glucose starvation. *Sci Rep*. 2022;12:11533.
56. Danaher P, Warren S, Dennis L, D'Amico L, White A, Disis ML, et al. Gene expression markers of Tumor Infiltrating Leukocytes. *J Immunother Cancer*. 2017;5:18.
57. Zhao Q, Laverdure JP, Lanoix J, Durette C, Cote C, Bonnell E, et al. Proteogenomics uncovers a vast repertoire of shared tumor-specific antigens in ovarian cancer. *Cancer Immunol Res*. 2020;8:544-55.
58. Kina E, Laverdure JP, Durette C, Lanoix J, Courcelles M, Zhao Q, et al. Breast cancer immunopeptidomes contain numerous shared tumor antigens. *J Clin Invest*. 2024;134:e166740.
59. Saini SK, Ørskov AD, Bjerregaard AM, Unnikrishnan A, Holmberg-Thydrén S, Borch A, et al. Human endogenous retroviruses form a reservoir of T cell targets in hematological cancers. *Nat Commun*. 2020;11:5660.
60. Onishi-Seebacher M, Erikson G, Sawitzki Z, Ryan D, Greve G, Lübbert M, et al. Repeat to gene expression ratios in leukemic blast cells can stratify risk prediction in acute myeloid leukemia. *BMC Med Genom*. 2021;14:166.
61. Ohtani H, Ørskov AD, Helbo AS, Gillberg L, Liu M, Zhou W, et al. Activation of a subset of evolutionarily young transposable elements and innate immunity are linked to clinical responses to 5-azacytidine. *Cancer Res*. 2020;80:2441-50.
62. Tuorto F, Herbst F, Alerasoel N, Bender S, Popp O, Federico G, et al. The tRNA methyltransferase Dnmt2 is required for accurate polypeptide synthesis during haematopoiesis. *EMBO J*. 2015;34:2350-62.
63. Kong Y, Rose CM, Cass AA, Williams AG, Darwish M, Lianglou S, et al. Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nat Commun*. 2019;10:5228.
64. Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:341-54.
65. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:7922-7.
66. Paludan C, Schmidt D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*. 2005;307:593-6.

67. Blanchet FP, Moris A, Nikolic DS, Lehmann M, Cardinaud S, Stalker R, et al. Human immunodeficiency virus-1 inhibition of immunomodulators in dendritic cells impairs early innate and adaptive immune responses. *Immunity*. 2010;32:654–69.
68. Liu M, Müller A, Steinbach K, Niven J, Barreira da Silva R, Paul P, et al. Macroautophagy proteins control MHC class I levels on dendritic cells and shape anti-viral CD8(+) T cell responses. *Cell Rep*. 2016;15:1076–87.
69. Parekh VV, Pabissety SK, Wu L, Sebзда E, Martinez J, Zhang J, et al. Autophagy-related protein Vps34 controls the homeostasis and function of antigen cross-presenting CD80(+) dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:E6371–e6380.
70. Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:14050–5.
71. Lei Y, Wen H, Yu Y, Taxman DJ, Zhang L, Widman DG, et al. The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity*. 2012;36:933–46.
72. Xu C, Li T, Lei J, Zhang Y, Zhou J, Hu B. The autophagy cargo receptor SQSTM1 inhibits infectious bursal disease virus infection through selective autophagic degradation of double-stranded viral RNA. *Viruses*. 2021;13:2494.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Anca Apavaloaei, Jean-David Larouche, and Maria Virginia Ruiz Cuevas for valuable discussions and suggestions. We also want to thank Caroline Côté, Jallia Chagraoui, and Eugénie Goupil for technical assistance and advice regarding autophagy experiments and immunofluorescence analyses and Jeremy Zumer for advice regarding normalization methods of the mass spectrometry data. We are grateful to the IRC genomics core facility, flow cytometry platform, Christian Charbonneau from the Microscopy facility, and Patrick Gendron from the IRC bioinformatics platform. This study was supported by grants from the Leukemia and Lymphoma Society of Canada and the Cancer Research Society (CP). This study was also supported by the "Promouvoir la Recherche" Foundation, Leon Fredericq Foundation, and the Fund Suzanne Duschene & the Fund Serge Rousseau, managed by the King Baudouin Foundation. N.N. is supported by doctoral studentships from the IRC and the Fonds de Recherche du Québec – Santé. J.H. is supported by post-doctoral fellowships from the Cole Foundation and the Power Corporation of Canada. B.E.S. and J.C. are research fellows of the FNRS. G.E. is a research associate at the FNRS and has been supported by post-doctoral fellowships from the IRC, FRQS, The Cole Foundation, and the FNRS. F.B. is a senior research associate at the FNRS.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NN, CP, and GE designed the study. NN and GE performed all cell culture experiments, bioinformatic analyses, and data interpretation. GE built databases for mass spectrometry analysis and performed main bioinformatics analysis on

differentially expressed MAPs and RNA-seq from the AML Leucegene cohort. C.D. and J.L. performed immunoprecipitation and mass spectrometry experiments. M.C. contributed to the design of the autophagy experiments and performed all the western blots in the study. J.C. and B.E.S. contributed to cell culture experiments and performed functional assays. J.H. and A.S. provided bioinformatics assistance in analyzing immunofluorescence data. M.P.H., K.V., J.-P.L., F.B., P.T., and C.P. contributed to analyzing and interpreting the data. NN, C.P. and G.E. wrote the manuscript, and all authors edited and approved the final manuscript. GE, C.P. and P.T. are co-senior authors of the present study.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.


ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02250-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Gregory Ehx.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Résumé

La recherche entreprise au cours de ma thèse explore divers aspects des réponses du système immunitaire après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (allo-HSCT), mettant l'accent sur la prévention de la GVHD et l'amélioration de l'effet GvT. Mes projets englobent une variété d'approches novatrices.

Dans une démarche translationnelle, mes investigations se dirigent vers l'utilisation de modèles murins humanisés offrant une plateforme unique pour examiner la reconstitution immunitaire dans un contexte plus proche de la réalité clinique. À cet égard, une évaluation de l'impact de l'Itacitinib, un inhibiteur spécifique de JAK1, a été entreprise visant à moduler de manière précise les réponses immunitaires post-greffe. De plus, une étude comparative de la prise de greffe, de la pathogenèse de la GVHD et l'effet GvT a été réalisée entre les souris NSG et NSG-IL15. Ces recherches ont permis d'enrichir notre compréhension des interactions complexes entre le système immunitaire, l'IL-15 et la GVHD.

Cette approche intégrée contribue de manière significative à l'avancement des stratégies thérapeutiques pour la prévention de la GVHD post-greffe. L'objectif global de ces travaux est d'approfondir notre compréhension des mécanismes immunologiques sous-jacents à la GVHD et à l'effet GvT dans le but d'ouvrir la voie à des approches novatrices, visant à améliorer de manière substantielle les résultats cliniques pour les patients ayant subi une allo-HSCT.

Summary

The research conducted during my thesis explores various aspects of the immune system responses following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), with a focus on preventing GVHD and enhancing the GvT effect. My projects encompass a variety of innovative approaches.

In a translational approach, my investigations are directed towards the use of humanized murine models providing a unique platform to examine immune reconstitution in a context closer to clinical reality. In this regard, an evaluation of the impact of Itacitinib, a specific JAK1 inhibitor, has been undertaken aiming to precisely modulate post-transplant immune responses. Additionally, a comparative study of engraftment, GVHD pathogenesis, and the GvT effect has been conducted between NSG and NSG-IL15 mice. These research endeavors have enriched our understanding of the complex interactions between the immune system, IL-15, and GVHD.

This integrated approach significantly contributes to advancing therapeutic strategies for preventing post-transplant GVHD. The overall goal of these efforts is to deepen our understanding of the underlying immunological mechanisms of GVHD and the GvT effect with the aim of paving the way for innovative approaches to substantially improve clinical outcomes for patients undergoing allo-HSCT.

