

Université de Montréal

**Traitement de la maladie du greffon contre l'hôte
chronique par la photophérèse extra corporelle au
TH9402**

**Mécanisme de régulation de la maladie du greffon contre l'hôte
chronique par les cellules T régulatrices**

par

Jean-Philippe Bastien

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Biomédicales

31 août 2013

© Jean-Philippe Bastien, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

**Traitement de la maladie du greffon chronique par la photophérèse extra corporelle
au TH9402**

Présentée par :
Jean-Philippe Bastien

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-Sébastien Delisle, président-rapporteur
Denis-Claude Roy, directeur de recherche
Dr. Michel Duval, membre du jury
Dr. Ciriaco Piccirillo, examinateur externe
Dr. Elie Haddad, représentant du doyen de la FES

Résumé

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est la principale cause de mortalité et de morbidité suite aux greffes de cellules souches hématopoïétiques. Plusieurs patients demeurent réfractaires aux traitements actuels ce qui rend nécessaire le développement de nouvelles stratégies afin de combattre cette maladie. Dans l'étude qui suit, nous avons utilisé un nouvel agent thérapeutique, le TH9402, une molécule photosensible et démontré qu'elle permet, lorsqu'exposée à la lumière visible (514 nm), d'éliminer sélectivement les cellules T activées *in vivo* tout en préservant les cellules T au repos et les cellules T régulatrices (Tregs). Les Tregs ainsi préservés peuvent abroger la réponse alloréactive par la sécrétion d'IL-10 ou par contact cellule-cellule via un mécanisme impliquant le CTLA-4. Nous avons découvert que la signalisation du CTLA-4 était associée à une hausse de la population Treg *in vitro*. Cette hausse est due à la conversion de cellules T CD4+CD25- en Tregs et non à une prolifération sélective des Tregs.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons démontré que la signalisation de CTLA-4 était associée à une augmentation de l'expression de la protéine Indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO). Ces effets nécessitent la déplétion du tryptophane ainsi que de la protéine de phase aigue GCN2. Finalement, nous avons observé que l'infusion de cellules traitées au TH9402 chez des patients souffrant de GVHD chronique est associée à une augmentation de la population Treg chez ces patients sans causer de lymphopénie ni de diminution de la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes viraux. Ces résultats suggèrent que le traitement au TH9402 pourrait représenter une approche particulièrement intéressante pour le traitement de la GVHD chronique réfractaire aux traitements actuels. De plus, l'augmentation de l'expression d'IDO pourrait être utilisée comme valeur prédictive de la réponse du patient au traitement. Ceci pourrait permettre d'améliorer la qualité de soins ainsi que de la qualité de vie des patients souffrant de GVHD chronique.

Mots-clés : GVHD chronique, TH9402, Cellule T régulatrice, CTLA-4 IDO, GCN2, Cellules dendritiques

Abstract

Graft versus host disease (GVHD) is the primary cause of mortality and morbidity following hematopoietic stem cell transplantation. Many patients remain refractory to current treatments, emphasizing the need to develop new therapeutic strategies. In the present study, we have used a novel therapeutic agent, TH9402, and shown that once activated by visible light (514 nm), this photosensitizer becomes specifically cytotoxic toward activated T cells while preserving resting T cells and regulatory T cells (Tregs). Preserved Tregs can display anti GVHD activity through IL-10 and CTLA-4 dependent mechanisms. Furthermore, CTLA-4 signaling was associated with an increased Treg population. This increase resulted from FOXP3 induction in CD4+CD25- cells and not selective proliferation of Tregs.

In the second part of this study, we showed that CTLA-4 signaling was associated with enhanced expression of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO). The expression of IDO results in the generation of anti GVHD activity and an increase in the Treg population following TH9402 treatment. This increased Treg population was mediated by tryptophan degradation and implied acute phase protein GCN2 activity. Finally, we show that the infusion of TH9402 treated cells in patients suffering from chronic GVHD resulted in an increase of the Treg population as early as 8 weeks after treatment initiation without causing lymphopenia or hyporesponsiveness toward viral antigens. Furthermore, the increase of IDO corresponded to patient response to treatment. These results suggest that TH9402 represents a most interesting therapeutic approach for patients with refractory chronic GVHD. IDO expression could also be used to predict patient responsiveness to the treatment. This could increase the quality of the treatment as well as the quality of life of patients suffering from refractory chronic GVHD.

Keywords : Chronic GVHD, TH9402, Regulatory T cells, CTLA-4 IDO, GCN2, Dendritic cells.

Table des matières

Chapitre 1	15
Revue de littérature	15
1. Les cancers hématologiques.....	16
2. Traitement des cancers hématologiques.....	18
2.1. Chimiothérapie.....	18
2.2. Les greffes de moelle osseuse.....	18
3. La réponse immunitaire T.....	22
3.1. La réponse T CD4.....	25
4. Les cellules T régulatrices (Tregs).....	32
4.1. Treg CD4+CD25+FoxP3+.....	33
4.2. Tregs CD4+ FoxP3-.....	38
4.3. Les Tregs CD8+.....	39
4.4. Cellules double négatives.....	41
4.5. Différence entre la souris et l'homme.....	42
5. Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO).....	43
6. La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).....	45
6.1. GVHD aigüe.....	47
6.2 La voie CTLA-4/ IDO dans la GVHD.....	60
7. GVHD chronique (cGVHD).....	61
8. Les traitements de la cGVHD.....	66
8.1. Les agents visant l'élimination des cellules T activées.....	68
8.2. Les agents visant l'expansion des Tregs.....	71
9. La photophérèse extracorporelle (ECP).....	76
10. TH9402.....	79
11. Hypothèse et objectifs.....	82
Hypothèse.....	82
Objectifs.....	82

Chapitre 2 : Article 1	83
Introduction	87
Patients, materials, and methods	89
<i>Patients and healthy donors</i>	89
<i>Photodepletion</i>	89
<i>EdU proliferation assay</i>	91
<i>Flow cytometry analysis</i>	91
Flow cytometry assessment was performed using: FITC-conjugated anti-CD4 (clone RPA-T4), anti-CD8 (clone RPA-T8), anti-CD25 (clone M-A251), PE-conjugated anti-CD25 (clone M-A251), APC conjugated anti-CD8 (clone RPA-T8) (all from Becton Dickinson (BD) Bioscience, Mississauga, ON Canada), and PerCP-conjugated anti-CD4 (clone MEM-241) (Abcam, Cambridge, MA, USA) monoclonal antibodies. For intracellular staining, PE-conjugated anti-FOXP3 (clone PCH101, eBioscience, San Diego, CA, USA) was used according to manufacturer's instructions. Intracellular IL-10 expression was measured using an APC-conjugated anti-human IL-10 antibody (clone JES3-19F1, Biolegend, San Diego, CA, USA). Prior to staining, cytokine production was stimulated by 0.05 µg/mL PMA / 0.5 µg/mL ionomycin for 4 hours, and 50 µg/mL brefeldin A (all Sigma-Aldrich) added for the last 2 hours. All stainings were made in the presence of unconjugated FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) at saturation in order to prevent non-specific staining. 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (BD Bioscience) was also added prior to analysis of cells without intracellular staining in order to exclude dead cells. CD4 ⁺ CD25 ⁻ cells were isolated and stained with a mitochondrial dye (Mitotracker Deep Red, Invitrogen) prior to co-culture to enable their discrimination from the CD4 ⁺ CD25 ⁺ cells added. FOXP3 analysis of cells from patients in the clinical study was performed in triplicate. At least 5x10 ⁴ events were acquired using FACS LSRII (BD Bioscience), and analyzed using Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).....	91
<i>Regulatory T cell depletion and isolation</i>	92
<i>Cytokine titration</i>	92

<i>Functional inhibition of Treg mediators</i>	92
<i>Statistical analysis</i>	92
<i>Results</i>	93
Chapitre 3 : Article 2	124
Photodepletion of PBMCs	137
<u>TH9402-induced photodepletion</u>	145
<u>Tregs and CD4+ T cell isolation</u>	148
<u>Inhibition of Treg mediators</u>	149
<u>Statistical analysis</u>	149
Chapitre 4.	170
Résultats Supplémentaires	170
1. La préservation des Tregs est nécessaire à la tolérance induite par la photodéplétion dans le contexte de la prévention de la GVHD.	171
Matériel et méthode.....	171
Résultats	172
2. La photodéplétion au TH9402 favorise la réponse Th2 au détriment de la réponse Th1 dans le contexte du traitement de la cGVHD.	173
Matériel et Méthode	173
Résultats	174
3. Les cellules photodéplétées ont un effet inhibiteur sur les cellules CD8 de manière CTLA-4 et IDO dépendante.....	175
Matériel et méthode.....	176
Résultats	176
4. L'activité de CTLA-4 induit une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation chez les APCs de manière indépendante de l'Activité catalytique d'IDO..	179
Matériel et méthodes	179
Résultats	179
5. Les patients atteints de cGVHD <i>de novo</i> possèdent un plus grand nombre de Tregs	
181	

Matériel et méthode.....	181
Résultat.....	181
Autres contributions.....	183
SPECIFIC ELIMINATION OF ALLOREACTIVE T LYMPHOCYTES USING TH9402-BASED PHOTODYNAMIC CELL THERAPY.....	183
Chapitre 5.....	184
Discussion.....	184
Conclusion.....	201
Annexe.....	i
Selective T cell depletion for.....	i
Haplotype mismatched allogeneic stem cell transplantation.....	i
Running title: Selective T cell allodepletion for haplo-transplantation.....	ii

Liste des tableaux

Tableau 1 Gradation de la GVHD aigue selon les organes touchés.	48
--	----

Liste des figures

Figure 1 Probabilité de rechute suite aux différents effets secondaires lors de greffes de cellules souches hématopoïétique allogéniques ou syngéniques. Modifié de ¹⁶	21
Figure 2 Sélections positive et négative des cellules T (Modifié de ¹⁴).....	23
Figure 3 Molécules de co-stimulation des cellules T (Modifié de ¹⁹).....	24
Figure 4 Cycle de vie des cellules T à partir de leur entrée dans la circulation. (Tiré du ²⁰)	24
Figure 5 Développement des cellules CD4 de type Th1, Th1, Th17 et Tregs selon la présence de différentes cytokines dans le milieu. Modifié de ²²	25
Figure 6 La stimulation du TCR avec co-stimulation CD28 et la signalisation d'IL-2 et de TGF- β sont importantes dans le développement des Tregs. (Tiré de ⁴⁷)	29
Figure 7 Différents mécanismes d'action des Tregs pour supprimer la réponse immunitaire (Modifié de ⁹²).....	37
Figure 8 La cascade du catabolisme du tryptophane est initiée par l'enzymeIDO (tiré de ¹⁵⁴)	43
Figure 9 Le catabolisme du tryptophane entraîne des changements dans les cellules T. Le manque d'acides aminés essentiels amène l'activation de la kinase GCN2. Qui peut induire un phénotype Treg dans les cellules T naïves, mais également activer les Tregs. (Modifié de ¹⁷³)	45
Figure 10 Pathophysiologie de la GVHD aigüe. Modifié de ¹⁷⁹	49
Figure 11 Pathophysiologie de la cGVHD (Modifié de ²⁴⁵)	62
Figure 12 Les Tregs ont une dynamique différente lors de l'aGVHD et de la cGVHD.....	66
Figure 13 Mécanisme d'action des agents photosensibles.....	78
Figure 14 Mécanisme d'inhibition de la synthèse d'ADN du 8-MOP. Le 8-MOP crée des liens covalents entre les bases adénines et thymine de l'ADN. (Tiré de ³⁴⁸)	79
Figure 15 Molécule de dibromo rhodamine, 123-méthyl-ester (TH9402)	80
Figure 16 Le traitement au TH9402 préserve une petite population de cellules CD4+ exprimant CD25 et qui pourraient représenter des cellules Tregs (Tiré de ³⁵¹).....	81

- Figure 17 **La préservation des Tregs est nécessaire à la tolérance induite par la photodéplétion dans le contexte de la prévention de la GVHD.** Les souris Balb/c ont été irradiées létalement et ont reçu une greffe d'HSC ainsi que des cellules T afin de déclencher une GVHD létale. Les cellules T injectées aux souris étaient traitées à la photodéplétion ou non et déplétées ou non en cellules CD4+CD25+. 172
- Figure 18 **Les cellules photodéplétées augmentent la réponse Th2 et diminuent la réponse Th1 de manière Treg dépendante.** Des cellules provenant de patients atteints de cGVHD ont été mises en culture avec des cellules photodéplétées ou non provenant du même patient pendant 5 jours. Les cellules photodéplétées étaient déplétées ou non en cellules CD4+CD25+. Après restimulation, le taux de cellules exprimant IFN- γ et IL-4 a été évalué par cytométrie en flux..... 174
- Figure 19 **La photodéplétion entraîne une baisse de l'activité des cellules T CD8 par augmentation de l'apoptose.** Des PBMC provenant de patients cGVHD ont été cultivés en présence de cellules photodéplétées ou non provenant du même patient en présence ou absence de 1-MT. A. L'expression du facteur pro-apoptique CHOP a été évaluée par cytométrie en flux. B. L'expression du marqueur de dégranulation des cellules T CD8, CD107a a été évalué par cytométrie en flux. C. Les PBMCs provenant d'un patient atteint de cGVHD ont été incubés avec du Cr⁵¹. L'activité cytotoxique des cellules photodéplétées été évaluée par un essai de relâche de Cr⁵¹..... 177
- Figure 20 **La photodéplétion permet l'enrichissement des cellules T régulatrices CD8+CD28- et cellules double négatives.** Des PBMCs provenant de patients atteints de cGVHD ont été exposés à la photodéplétion. La proportion et le nombre absolu de cellules T régulatrices A. CD8+CD28- et B. CD4-CD8- survivant au traitement fut évaluée par cytométrie en flux. 178
- Figure 21 **L'activité de CTLA-4 induit un phénotype tolérogénique chez les APCs.** Les APCs d'un patient cGVHD ont été induits à partir de ses propres monocytes. Les APCs ont ensuite été exposées au LPS pour favoriser la maturation de ces derniers. Les cellules ont également été exposées au CTLA-4-Ig et au 1-MT. L'expression d'IL-12 ainsi que des molécules de co-stimulation CD83 et CD86 a été évaluée par

cytométrie en flux. Est présenté en A. un exemple représentatif et B. une compilation de 4 expériences indépendantes. 180

Figure 22 Les patients souffrant de cGVHD *de novo* ont une augmentation des Tregs comparé aux patients ayant préalablement eu l'aGVHD. Le taux de Tregs des patients souffrant de cGVHD réfractaire a été relevé en fonction du type de cGVHD du patient. Le taux de Tregs a été déterminé par cytométrie en flux. 182

*Je dédie cette thèse à ma famille, plus
précisément à mes parents, Michèle et
Édouard Bastien ainsi qu'à ma sœur, à mon
beau frère Carl et ma grand-mère qui m'ont
toujours appuyé dans les bons moments ainsi
que dans les moins bons. Ils m'ont toujours
encouragé dans la poursuite de mes études et
m'ont permis de me concentrer sur mes
études. À mon neveu Antoine, j'espère que les
résultats de cette thèse ne te seront jamais
utiles, mais qu'il puisse aider les gens de ton
âge. Je dédie également cette thèse à ma
chérie Geneviève. Elle a su comprendre et
accepter tout ce qu'impliquait cette thèse et
aussi m'a appuyé dans les bons comme dans
les moins bons moments. Finalement, je dédie
cette thèse à tous mes coéquipiers (et
adversaires) de water polo et de soccer. Vous
m'avez permis de me changer les idées et de
garder un équilibre tout au long de ma thèse.
Votre rôle est plus grand que vous ne le
pensez.*

Remerciements

Je remercie d'abord le Dr. Denis-Claude Roy qui m'a accueilli dans son laboratoire ainsi que Dr. Gorazd Krosi et Dr. Vibhuti Dave qui ont travaillé comme associés de recherche dans notre laboratoire. Nos longues discussions et leur « challenges » de mes résultats ont permis de faire avancer ce projet. Ces mêmes discussions m'ont permis de découvrir de nouvelles cultures et m'améliorer comme être humain.

J'aimerais également remercier les membres de notre laboratoire, spécialement Marie-Pier Giard, Pierre Fokam et Radia Sidi Boumedine qui m'ont appris les rudiments de la recherche. Je les remercie également pour la camaraderie qui régnait dans le laboratoire qui rendait les journées agréables même dans les temps les plus difficiles. Je tiens à souligner également le travail des techniciennes du Laboratoire de thérapie cellulaire de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, et particulièrement Cynthia Therien, qui m'ont permis de travailler avec les échantillons de patients. Je remercie également les étudiants des autres laboratoires, spécialement Marie-Ève Koué et Ingrid Agbato du laboratoire du Dr. Kouassi ainsi que Stéphanie Thiant du laboratoire du Dr Guimond qui au fil des discussions m'ont aidés à trouver des idées lorsque les manipulations expérimentales ne fonctionnaient pas.

Je remercie particulièrement les stagiaires qui sont passés sous ma supervision au laboratoire : Marissa Rashkovan, Élise Cournoyer et Camille Martel. Leur travail et leur questionnement a permis de faire avancer le projet.

Finalement, je remercie les autres chercheurs du centre de recherche. Autant ceux qui apportaient des commentaires positifs sur le projet que ceux qui le critiquaient. Les premiers ont permis de renforcer nos histoires alors pour les seconds m'ont fait redoubler d'ardeur.

Introduction

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est la principale cause de mortalité et de morbidité suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. En effet, les traitements actuels de cette grave maladie n'ont qu'un effet limité et possèdent des effets secondaires importants. De plus, ces traitements peuvent nuire au système immunitaire dans sa réponse contre les infections et être associés à une récurrence tumorale (rechute). Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques en développement figure la photophérese extracorporelle. Cette dernière induit la mort par apoptose des lymphocytes du patient ex vivo. Une fois réinjectés, ces derniers seront phagocytés par les cellules présentatrices d'antigènes qui arboreront alors un phénotype tolérogénique. Cependant, ce ne sont pas tous les lymphocytes qui causent la GVHD. Une manière optimale de combattre la GVHD serait d'éliminer uniquement les cellules responsables de la GVHD tout en épargnant les cellules au repos capables d'éventuellement s'activer contre les infections et les cellules tumorales. Cependant, peu de molécules possèdent ces propriétés.

C'est dans cette optique qu'avec le TH9402, retenu préférentiellement dans les cellules T activées (potentiellement les cellules responsables de la GVHD), nous avons voulu mieux comprendre les mécanismes d'action de cette stratégie cellulaire et développer de nouveaux outils pour combattre la GVHD. En effet, nous avons postulé que le TH9402 pouvait éliminer préférentiellement les cellules alloréactives générées chez le patient en post-greffe de cellules souches, tout en préservant les cellules T au repos. Ceci pourrait entraîner un effet anti-inflammatoire chez le patient et induire une réponse clinique.

De plus, d'autres populations sont capables de contenir la GVHD telles que les cellules T régulatrices. Ces populations étant souvent altérées lors de la GVHD, il serait alors important de décrire l'effet du traitement au TH9402 sur ces populations.

Nouveauté de la recherche

Bien que la capacité d'élimination sélective des cellules T alloréactives tout en préservant les cellules T au repos aie été identifié, l'effet du TH9402 sur les Tregs demeure un mystère. Dans cette thèse, nous sommes les premiers à identifier le mécanisme d'action du TH9402 qui permet non seulement l'élimination des cellules T alloréactives, mais préserve les Tregs et diminuant ainsi la GVHD. De plus, les cellules traitées au TH9402 ont la capacité d'induire le phénotype Treg dans les cellules T conventionnelles, un processus dépendant de l'activité de CTLA-4.

Une des principales limitations potentielles de l'utilisation de la photophérese extracorporelle est le bas taux de cellules présentatrices d'antigène (APC) retrouvées chez les patients souffrant de GVHD. Dans le contexte de la GVHD chronique, en présence d'un taux très bas d'APC, nous avons découvert que les Tregs peuvent exprimer la molécule immunosuppressive indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) et induire eux-même le phénotype Treg dans les cellules T conventionnelles.

Chapitre 1

Revue de littérature

1. Les cancers hématologiques

Les cellules sanguines proviennent d'une population de cellules souches résidant dans la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques (HSC). Suite à une série de divisions et différents processus de différenciation, les HSC produisent les cellules retrouvées dans le sang, soit les érythrocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les monocytes et les plaquettes formant la lignée dite myéloïde ainsi que les cellules B, les cellules T et les cellules NK qui forment la lignée dite lymphoïde. Les cancers hématologiques sont des désordres malins du développement des cellules sanguines. Ces maladies peuvent originer de la moelle osseuse qui est le siège de l'hématopoïèse, ce qui peut entraîner des leucémies. Lorsqu'il s'agit de désordres provenant d'organes lymphoïdes, il est alors question de lymphomes ou de myélomes multiples.

Les cancers hématologiques se définissent selon le stade de développement des cellules impliquées. Ainsi, lorsque les cellules leucémiques ont un stade de développement primitif, elles sont dites aiguës¹. Les cellules leucémiques sont habituellement retrouvées dans le sang et dans la moelle. Elles possèdent un phénotype immatures (ou blastes). Les leucémies aiguës présentent un blocage dans la différenciation des cellules hématopoïétiques à partir des HSC. Ces cellules prolifèrent beaucoup et sont généralement résistantes à l'apoptose². L'entrée dans la circulation de ces cellules immatures se fait au détriment des cellules matures saines, ce qui résulte en une perte des cellules matures et donc en l'incapacité de celles-ci d'exercer leur fonction. Plus le blocage est situé tôt dans la différenciation des cellules hématopoïétiques, plus les cellules du sang s'apparentent alors aux HSC, entraînant un déficit au niveau de la descendance de ces lignées dans le sang. Les leucémies sont également classées selon le type de cellules impliquées. Ainsi la présence de myéloblastes ou de cellules myéloïdes indique une leucémie de la lignée myéloïde alors que la présence de lymphoblastes ou de cellules lymphoïdes indique une leucémie de la lignée lymphoïde. Par contre, lorsque les cellules retrouvées dans le sang ont une progression plus lente, cette leucémie est dite chronique³. Les cellules malignes retrouvées

dans le sang ont alors souvent un aspect mature. L'évolution des leucémies chroniques peut se faire sur plusieurs mois voire des années.

Les lymphomes sont des désordres malins ayant pour origine les organes lymphoïdes. Ce sont des cancers des cellules lymphoïdes matures. Lors des stades primitifs, les lymphomes n'atteignent qu'un seul ganglion lymphatique et, lors de l'évolution de la maladie, le lymphome peut se disséminer aux autres organes lymphoïdes et aux tissus, incluant la moelle osseuse. Selon l'organisme mondial de la santé, il existe plus de 60 types de lymphomes, dont cinq sont de type Hodgkinien. Les lymphomes Hodgkiniens sont caractérisés par la présence de cellules de Reed-Sternberg, cellules multinucléées dérivées des cellules B, habituellement CD15 et CD30 positives et sont généralement plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques⁴. Inversement, l'absence de ce type cellulaire ainsi que des caractéristiques morphologiques distinctes sont associées à la présence d'un lymphome de type non-Hodgkinien. Les lymphomes sont également classés selon la lignée des cellules malignes et peuvent donc être de type B ou T. Il existe plusieurs façons de classer les lymphomes en fonction de la taille, du type et du grade de malignité des cellules. Les lymphomes les moins agressifs possèdent une prolifération plutôt lente. Les atteintes moléculaires de ces cellules sont souvent au niveau de gènes favorisant l'apoptose et l'accumulation de ces cellules résulte d'une diminution de la mort cellulaire⁵. Par opposition, les lymphomes agressifs présentent souvent une prolifération accélérée. Les atteintes moléculaires de ces cellules se situent principalement au niveau des oncogènes, résultant en une prolifération accrue des cellules⁵. La prolifération de ces cellules peut même être supérieure à celle retrouvées dans les leucémies aiguës. De manière paradoxale, les lymphomes indolents peuvent être contrôlés, mais sont souvent incurables alors que les lymphomes agressifs requièrent des traitements plus agressifs, mais ces traitements peuvent induire une rémission complète du patient⁶.

Les myélomes multiples impliquent une infiltration de la moelle osseuse par des plasmocytes sécrétant des immunoglobulines (IgG, IgA ou IgM)⁷ ou encore des chaînes légères. Ces cellules proviennent des centres germinaux des ganglions lymphatiques du

patient. Cette infiltration entraîne une résorption osseuse accrue et une diminution de l'hématopoïèse normale⁷. L'importance et le taux élevé de mortalité des cancers hématologiques requiert que l'on porte une attention particulière aux traitements de ces derniers.

2. Traitement des cancers hématologiques

Comme décrit plus haut, il existe une grande variété de cancers hématologiques. Leur physiopathologie est très variable. Ceci leur confère une grande disparité au niveau de leur réponse aux différents agents thérapeutiques⁸. Ainsi, plusieurs traitements peuvent être utilisés en fonction du type de cancer retrouvé. Cette section aborde certains traitements communément utilisés pour les patients atteints de ces désordres, plus particulièrement les greffes de moelle osseuse qui deviennent le traitement de choix pour les patients avec des maladies récidivantes ou réfractaires au traitement conventionnel.

2.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie constitue le traitement de base pour plusieurs types de cancers hématologiques tels que les leucémies aiguës ou chroniques et les lymphomes. En effet, pour ces maladies, la chimiothérapie comprenant un seul agent ou une combinaison d'agents est souvent efficace pour entraîner une rémission chez les patients qui en sont atteints. Ces derniers peuvent être soit des molécules de chimiothérapie, entraînant une destruction des cellules tumorales, des anticorps dirigés contre les cellules tumorales (anti-CD20 pour les lymphomes B) ou des inhibiteurs spécifiques des protéines exprimées par les cellules tumorales (inhibiteurs de tyrosine kinase).

2.2. Les greffes de moelle osseuse

Historiquement, les maladies affectant la moelle osseuse, comme les leucémies aiguës, les leucémies myéloïdes chroniques en phase accélérée et crise blastique, les syndromes myélodysplasiques et les anémies aplasiques sévères étaient inévitablement mortelles pour les patients qui en étaient atteints⁹. Les avancées en matière de

chimiothérapie ont permis d'induire une rémission chez la majorité des patients atteints de leucémie aigue. Toutefois, ces rémissions sont souvent de courte durée et suivies d'une rechute si non traitées¹⁰.

Dans le but d'éradiquer les cellules tumorales, de hautes doses de chimiothérapie sont souvent nécessaires. Celles-ci ont également pour effet de détruire les cellules souches hématopoïétiques de la moelle du patient. Le patient est alors dans un état dit « aplasique », c'est-à-dire qu'il ne peut plus produire de nouvelles cellules sanguines. Une greffe est alors nécessaire pour suppléer au manque de HSC du patient. Il y a deux principaux types de greffe : l'autogreffe, lorsque les HSC proviennent de la moelle du patient lui-même, ou l'allogreffe lorsqu'elles proviennent d'une autre personne.

2.2.1. Les autogreffes

Les autogreffes sont utilisées dans les cas de lymphomes non Hodgkiniens ou de lymphomes Hodgkiniens réfractaires où la moelle osseuse du patient n'est souvent pas ou peu atteinte. La moelle du patient est collectée soit directement soit indirectement après un processus de mobilisation qui libère les HSC de la moelle osseuse et les oriente vers le sang. Les HSC ainsi prélevées sont alors congelées, puis le patient subit une chimiothérapie à haute dose qui détruira les cellules tumorales ainsi que les cellules souches du patient. Par la suite, l'injection des cellules souches congelées du patient sert de support pour assurer une reproduction des cellules sanguines. Les autogreffes ont pour avantage, étant donné que les cellules proviennent du patient lui-même, d'éliminer les risques de rejet de greffe et de maladie du greffon contre l'hôte. Par contre, ces cellules sont dépourvues d'effet anti-tumoral, ce qui entraîne un taux de rechute élevé¹¹. L'incidence de rechute est particulièrement élevée lorsque l'autogreffe est utilisée dans le traitement des leucémies aiguës, puisque la moelle osseuse est souvent infiltrée par des cellules leucémiques résiduelles, malgré un état de rémission clinique. Toutefois, le taux de rechute post-autogreffe est moins important que chez les patients traités par la chimiothérapie seule¹². De plus, des effets secondaires, tels que le syndrome myélodysplasique, sont observés dans 5 à 20% des cas^{11;13-15}. Pour remédier à ces problèmes, des transplantations séquentielle

(auto suivit d'une allogreffe) ont été utilisées avec efficacité¹³. Cette combinaison de greffes est également utilisée dans le traitement des myélomes multiples où l'on observe une baisse significative du taux de rechute et de mortalité comparativement aux autogreffes seules¹⁶.

2.2.2. Les allogreffes

Les allogreffes font partie intégrante du traitement des leucémies aiguës. En effet lorsque la moelle d'un patient est infiltrée par des cellules leucémiques, il devient alors plus difficile d'effectuer une autogreffe. Il est alors souvent préférable d'avoir recours à un donneur. Si ce donneur est un jumeau identique, il s'agit d'une greffe syngénique. Dans les autres cas, le donneur peut être soit un membre de la famille ou non. On parle alors d'une greffe allogénique apparentée ou non apparentée.

La compatibilité des gènes du groupe « Human Leucocyte Antigen » ou HLA entre le donneur et le receveur est très importante dans la réussite d'une allogreffe. Les gènes du groupe HLA codent pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH de classe I peut interagir avec les cellules T CD8 alors que le CMH de classe II peut interagir avec les cellules T CD4⁺¹⁷. Tout au long de leur éducation, les cellules T doivent interagir avec le CMH de l'hôte sans s'activer contre les antigènes de l'hôte.¹⁷ Les cellules du donneur n'ont pas reçu la même éducation que les cellules de l'hôte et pourraient donc reconnaître les antigènes de l'hôte comme non-soi et s'activer contre celles-ci. Ceci est la cause d'un effet secondaire délétère très important associé aux greffes de cellules souches : la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

L'incompatibilité au niveau d'autres gènes peut aussi entraîner la GVHD. Ces gènes sont appelés antigènes mineurs d'histocompatibilité¹⁸. Cependant, la recherche d'un donneur compatible peut s'avérer très compliquée. Plusieurs études ont démontré qu'il était possible d'effectuer des greffes de cellules souches entre des individus partageant un seul haplotype au niveau des gènes du HLA. Ces greffes sont appelées greffes haplo-identiques. Toutefois, il est nécessaire d'utiliser de fortes doses d'immunosuppresseurs ou des

stratégies immunosuppressives importantes afin d'éviter la GVHD. Nous discuterons de ces stratégies plus tard dans cette revue de littérature.

L'avantage des allogreffes sur les autogreffes n'est pas seulement d'offrir un greffon dénué de cellules malignes. En effet, dans les cas d'allogreffe, la présence d'un certain degré d'incompatibilité entre le donneur et le receveur, amène les cellules T du donneur à reconnaître les cellules tumorales résiduelles de l'hôte comme non-soi et développer une réponse immunitaire contre celles-ci. Ceci permet l'élimination des cellules tumorales/leucémiques et diminue les risques de rechute. Cette réaction immunologique se nomme effet greffon contre leucémie (GVL). Malheureusement, cet effet bénéfique est difficile à dissocier de la complication importante que représente la GVHD¹⁸. Certaines thérapies de la GVHD sont également associées à un plus haut taux de rechute. Il a d'ailleurs été démontré que les patients ayant présenté une GVHD courent moins de risques de subir une rechute que les patients n'ayant pas eu de GVHD ainsi que ceux ayant reçu une greffe syngénique (Voir Figure 1). Pour mieux comprendre le processus de GVHD, il est important de comprendre la réponse immunitaire T.

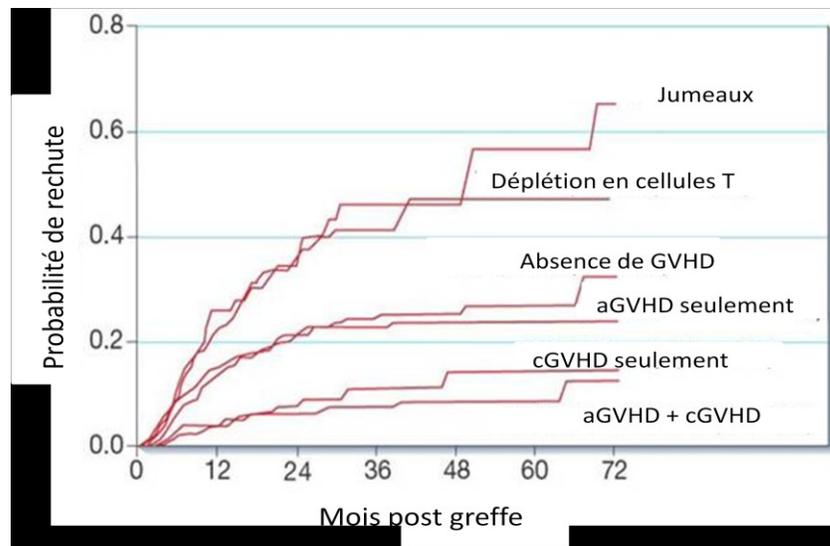


Figure 1 Probabilité de rechute suite aux différents effets secondaires lors de greffes de cellules souches hématopoïétique allogéniques ou syngéniques. Modifié de ¹⁹

3. La réponse immunitaire T

La réponse immunitaire T joue un rôle central dans le contrôle des infections et dans le développement des maladies auto-immunes ainsi que de la GVHD. Il existe deux principaux types de cellules T : les cellules T CD4+ (dites cellules T « helper ») et les cellules T CD8+ (dites T cytotoxiques). Les cellules T possèdent un récepteur de cellule T (TCR) qui est spécifique à un antigène précis. Les cellules T se développent dans le thymus à partir des progéniteurs T communs, mais peuvent également se développer à l'extérieur du thymus, dans les organes lymphoïdes²⁰. Dans le thymus, les précurseurs des cellules T ne possèdent ni le marqueur CD4, ni le marqueur CD8. Elles subiront premièrement une sélection positive à savoir si leur TCR peut interagir avec les molécules du CMH des cellules présentatrices d'antigènes du soi²¹. Si les cellules T parviennent à interagir avec le CMH du soi, elles survivront et exprimeront à la fois les marqueurs CD4 et CD8. Ces cellules sont dites double positives. Ces cellules passeront à une autre étape de la sélection des cellules T : la sélection négative²¹. Dans cette étape, les antigènes du soi seront présentés aux cellules T afin d'éliminer les cellules autoréactives. Seules les cellules incapables de former un lien de haute affinité avec les antigènes du soi survivront à cette étape²¹ (Voir Figure 2). Ce mécanisme permet d'éliminer les cellules auto-réactives et ainsi de limiter le nombre de maladies dites auto-immunes.

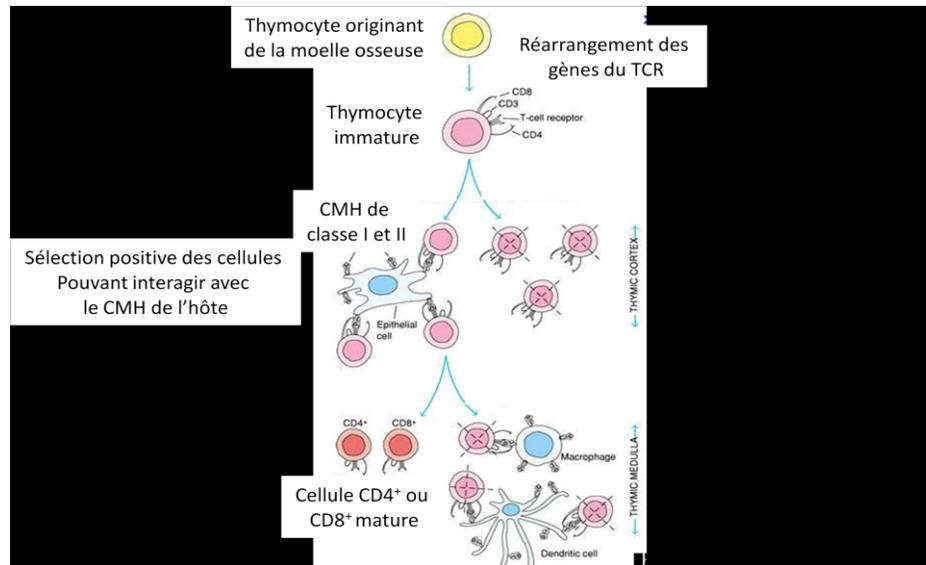


Figure 2 Sélections positive et négative des cellules T (Modifié de¹⁷)

Suite à leur activation par les APC, les cellules T entrent dans un cycle de divisions et exercent leurs fonctions dépendamment du type de cellule T. Toutefois, afin d'obtenir une activation complète, plusieurs signaux de co-stimulation sont nécessaires. Ces signaux de co-stimulation sont décrits dans la Figure 3. Suite à l'élimination de l'antigène, un grand pourcentage des lymphocytes T entrent en apoptose. Les cellules restantes deviennent alors des cellules T dites mémoires. Ces cellules nécessiteront alors moins de signaux de co-stimulation afin de s'activer.

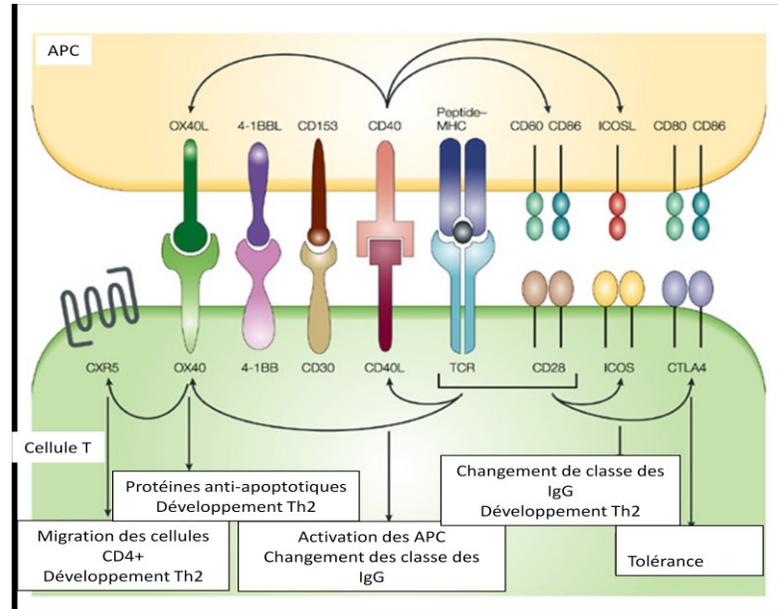


Figure 3 Molécules de co-stimulation des cellules T (Modifié de ²²)

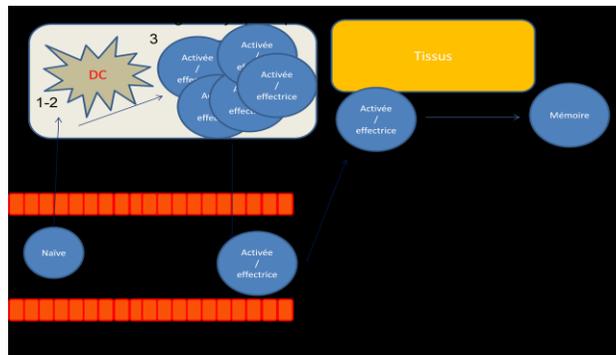


Figure 4 Cycle de vie des cellules T à partir de leur entrée dans la circulation. (Tiré du ²³)

Les cellules T sont également capables d'éliminer les cellules tumorales²⁴. Dans les greffes de moelle osseuses, cette capacité est exploitée afin de diminuer les risques de rechute, particulièrement dans les cas de maladies à haut risque. Dans le cadre de la présente thèse, mes travaux ont principalement porté sur l'étude des cellules T CD4+. Dans cette revue de littérature, nous allons donc discuter plus abondamment de la réponse T CD4.

3.1. La réponse T CD4

Les cellules T CD4 agissent comme intermédiaires de la réponse immunitaire. Leur réponse influence le type de réponse immunitaire préconisée. Il existe plusieurs types de réponse CD4. Parmi celles-ci, quatre ont été particulièrement étudiées et ont une implication directe dans la physiopathologie de la GVHD et des maladies auto-immunes. Il s'agit des réponses TH1, TH2, TH17 et T régulatrices (Tregs)²⁵.

Lors de la rencontre avec l'antigène et de l'activation d'une cellule T, celle-ci passe par un état transitoire dit TH0. La cellule est alors capable de sécréter les cytokines caractéristiques de tous les types de réponses. C'est l'interaction avec les APC ainsi que les cytokines présentes dans le milieu qui dictera le type de réponse CD4 préconisée (Voir Figure 5).

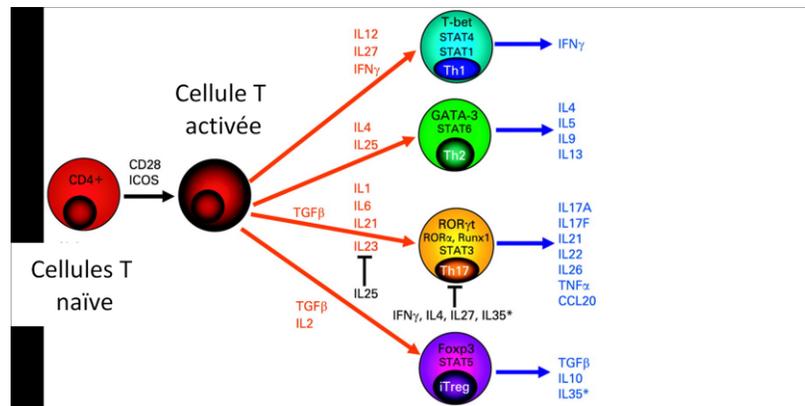


Figure 5 Développement des cellules CD4 de type Th1, Th2, Th17 et Tregs selon la présence de différentes cytokines dans le milieu. Modifié de ²⁵

3.1.1. Paradigme TH1 / TH2

Jusqu'à la fin de la dernière décennie, seules les réponses Th1 et Th2 étaient connues. Ces deux types de réponses étaient opposés. En effet, la réponse Th1 est associée à un type de réponse immunitaire dit cellulaire et inflammatoire. C'est-à-dire qu'elle favorise l'activité des cellules T cytotoxiques. Par opposition, la réponse TH2 favorise une réponse plutôt humorale médiée par les cellules B. Les principales cytokines sécrétées par

les cellules T CD4 lors d'une réponse de type Th1 sont l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- γ (IFN- γ). L'IL-2 étant un facteur favorisant la survie et la prolifération des cellules T alors que l'IFN- γ est une cytokine associée à la réponse cellulaire T^{26,27}. La principale cytokine sécrétée par les cellules T CD4 de type Th2 est l'IL-4, mais également l'IL-10, IL-5 et IL-13. L'IL-4 a un impact important sur les cellules B en favorisant une réponse humorale forte médiée par une sécrétion d'immunoglobulines G2 (IgG2). Par contre, l'IL-4 peut aussi engendrer la sécrétion d'immunoglobulines E (IgE), ce qui peut entraîner une réponse inflammatoire majeure. Cette réponse est retrouvée dans les chocs anaphylactiques. Il est donc crucial que les réponses Th1 et Th2 soient équilibrées, puisqu'un excès de l'une ou l'autre de ces réponses peut avoir des graves conséquences pour l'hôte. De plus, les cytokines sécrétées par les cellules T CD4 de type Th1 ont également un effet inhibiteur sur les cytokines de type Th2 et vice versa²⁸.

La présence de cytokines spécifiques dans le milieu dicte le type de réponse préconisée suite à l'activation des cellules T. Ainsi, la présence d'IL-12 dans le milieu favorise une réponse Th1. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'IL-12 stimule la phosphorylation du messager STAT4 qui à son tour favorise l'expression du facteur de transcription « *T-box expressed in T cells* » (T-bet), le facteur de transcription clé de la réponse Th1. Ce dernier contrôle l'expression d'IFN- γ ²⁹. L'induction de T-bet dans des cellules Th2 est associé à la perte du phénotype Th2 et la sécrétion d'IFN- γ par ces cellules^{29,30}. Par opposition, la présence d'IL-4 dans le milieu favorise la réponse Th2. En effet, IL-4 stimule la phosphorylation du messager STAT6 qui favorise l'expression du facteur de transcription GATA-3, facteur de transcription associé à la réponse Th2³¹. De plus, GATA-3 bloque la réponse Th1 en inhibant STAT4 ainsi que T-bet³².

3.1.2. Différenciation TH17 / Treg

Comme les cellules Th1 et Th2, les Th17 et les Tregs ont des rôles opposés. Toutefois, leur développement comporte des similitudes. Le développement des cellules Th17 chez la souris et chez l'homme est encore mal compris. Il est important de préciser que cette section décrit la différenciation des cellules Tregs en périphérie, qui diffère

quelque peu de celle du thymus. Il en sera question du développement thymique des Tregs lors de la prochaine section de cette revue de littérature. Chez la souris, la différenciation en cellules Th17 ou en Tregs nécessite le TGF- β . Il a été démontré que la signalisation du TGF- β est nécessaire à la différenciation des cellules Th17 et des Tregs³³. Le choix de la différenciation en l'un ou l'autre de ces types dépend des conditions du milieu. Effectivement, la présence des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-21 dans le microenvironnement promeut le développement des cellules Th17 tout en inhibant le développement des Tregs³⁴. Par contre, l'absence de ces cytokines³⁵ ainsi qu'une concentration élevée de TGF- β favorisent le développement des Tregs au détriment des cellules Th17^{36;37}.

Mécanismes de développement des Tregs

Les mécanismes de développement des Tregs et des cellules Th17 sont antagonistes. En effet, le développement des Tregs nécessite une stimulation du TCR, une co-stimulation de CD28 et l'action de TGF- β (Voir Figure 6). Cette différenciation est médiée par les molécules effectrices NFATc, produit de la stimulation du TCR, et de Smad3, produit de la signalisation de TGF- β . Ces molécules se lient alors à la région promotrice du gène FoxP3 pour en activer la transcription³⁸. NFAT peut également augmenter l'expression de plusieurs gènes favorisant l'anergie tels que *Grail* et *Caspase-3*^{39;40}. De plus, la molécule Lck, associée à la stimulation de CD28, entraîne la phosphorylation de STAT3, nécessaire au développement des Tregs ainsi qu'à la production des cytokines inhibitrices IL-10 et TGF- β sécrétées par les Tregs⁴¹. De plus, il a également été démontré que la co-stimulation par CD28 diminue la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17 par un mécanisme dépendant d'IL-2 et d'INF- γ ⁴². D'ailleurs, un blocage de la liaison de CD28 avec son ligand, B7, entraîne une diminution des Tregs et une augmentation des réponses auto-immunes^{43;44}. De plus, le blocage de l'activité de CD28 est associé à une augmentation de la réponse auto-immune dans un modèle de diabète auto-immun chez la souris⁴⁵.

La présence d'IL-2 est également critique dans le développement des Tregs. En effet, STAT5, fruit de la signalisation par l'IL-2, se lie à l'intron 1 du gène *foxp3* et favorise

son expression⁴⁶. Toutefois, en présence d'un niveau plus élevé d'IL-2, les Tregs associés aux tumeurs cultivées en présence de cellules tumorales pouvaient perdre l'expression de FoxP3, leur fonction inhibitrice, et arborer un profil Th17 ou Th1 avec une sécrétion accrue d'INF- γ et de TNF- α ⁴⁷. Le mécanisme moléculaire par lequel cette différenciation est accomplie n'a cependant pas été élucidé. Ceci souligne l'importance du niveau d'IL-2 : un niveau bas d'IL-2 favorise le développement des Tregs alors qu'un niveau élevé favorise la réponse inflammatoire.

L'activité de la protéine anti-inflammatoire indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) joue également un rôle dans la différenciation Treg/Th17. En effet, la signalisation TGF- β peut entraîner la phosphorylation d'IDO par l'intermédiaire de la tyrosine kinase fyn (revue dans ⁴⁸). L'activité de TGF- β peut également augmenter l'activité d'IDO via les tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2⁴⁹. Une fois phosphorylée, IDO peut inhiber l'activité de protéine favorisant l'induction des cellules Th17. Ainsi, IDO peut favoriser le développement des Tregs tout en inhibant le développement des cellules Th17. D'autres facteurs sont également capables d'induire IDO tels CTLA-4 et l'IFN- γ . L'IDO produit de cette manière favorise le développement des Tregs en périphérie et ne requiert pas la présence de TGF- β . Par contre, plusieurs facteurs favorisant le développement de lymphocytes Th17 peuvent dégrader IDO⁴⁸. IDO joue donc un rôle clé dans le développement des Tregs et Th17. L'activité d'IDO sera détaillée dans la section portant sur cette protéine.

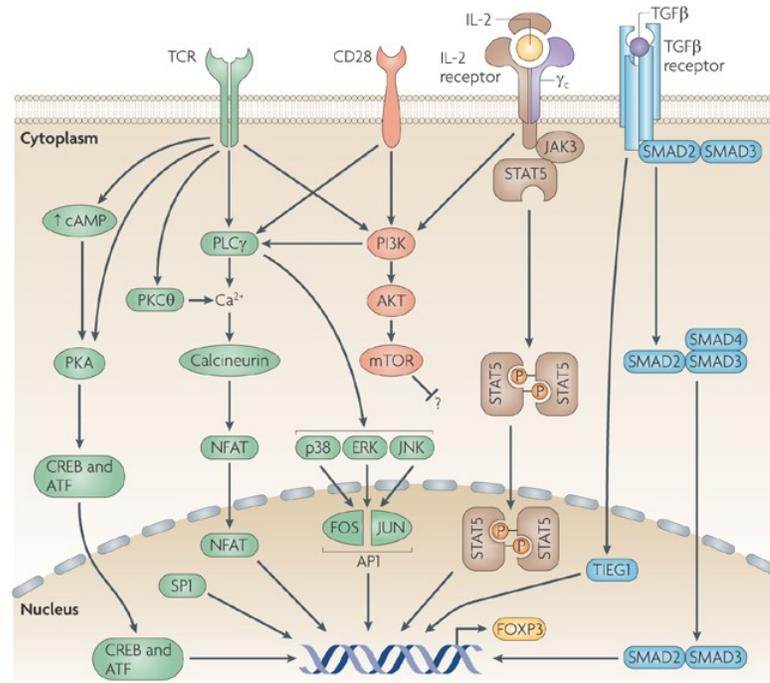


Figure 6 La stimulation du TCR avec co-stimulation CD28 et la signalisation d'IL-2 et de TGF- β sont importantes dans le développement des Tregs. (Tiré de ⁵⁰)

Mécanismes de développement des Th17

À l'inverse du développement des Tregs, la présence de facteurs inflammatoires favorise le développement des Th17. En effet, chez la souris, la présence d'IL-6 est suffisante pour inhiber le développement des Tregs à la faveur des Th17. Ainsi, la signalisation via l'IL-6 est associée à la phosphorylation de STAT3. Cette phosphorylation de STAT3 est effectuée par l'entremise de « *IL-1 associated kinase* » (IRAK-1), qui possède également la capacité d'inhiber la molécule effectrice NFATc⁵¹. STAT3 activée interagit alors avec Smad3 pour augmenter l'expression du facteur de transcription ROR γ t. De plus, la signalisation d'IL-6 est associée à l'augmentation de Smad7, qui inhibe l'activité de Smad3 et la transcription de FoxP3⁵². Il est important de noter que la molécule STAT3 est indispensable à la fois au développement des Tregs et à celui des cellules Th17. Ceci peut être expliqué par la manière avec laquelle STAT3 est phosphorylée. En effet, Lck-1 phosphoryle STAT3 au niveau de la tyrosine 705⁴¹ alors qu'IRAK-1 le phosphoryle

au niveau de la sérine 727⁵¹. Ceci peut expliquer le double rôle joué par STAT3 dans le développement de ces deux populations. D'ailleurs, certaines population de cellules T Th17 sécrètent également la cytokine anti-inflammatoire IL-10⁵³. Cette production d'IL-10 a récemment été attribuée au facteur de transcription c-maf, dont l'induction dépend également de la phosphorylation de STAT3⁵⁴.

Les cellules Th17 expriment également le récepteur pour l'IL-23, une cytokine pro-inflammatoire composée de la sous-unité p40 de l'IL-12 et d'une sous-unité p19 qui lui est spécifique. Cette cytokine est essentielle pour l'induction de cellules Th17 lors des maladies auto-immunes *in vivo*. Les souris déficientes en récepteur d'IL-23 ou en sous-unité p19 de l'IL-23 sont résistantes aux encéphalomyélites auto-immunes expérimentales⁵⁵. De plus, la signalisation par l'IL-23 promeut l'expression d'IL-17, mais inhibe l'expression d'IL-10⁵⁶.

L'activité des cellules Th17 est médiée par les cytokines IL-17, IL-21 et IL-23, mais aussi par l'IL-22. En effet, IL-22 est associée à une augmentation du dommage tissulaire dans les cas de psoriasis⁵⁷, mais également à une inhibition du dommage causé par les cellules T au niveau du foie⁵⁸. IL-22 est également indispensable pour l'immunité antimicrobienne^{59;60}.

Par opposition, chez l'homme, les conditions exactes requises pour induire les cellules Th17 n'ont pas été identifiées. En effet, la présence de TGF- β et d'IL-6 ne peut pas induire la différenciation des cellules Th17⁶¹. Il semble toutefois que la présence d'IL-1, IL-6 et IL-23 soit nécessaire pour entraîner la sécrétion d'IL-17 par les cellules T CD4. Par ailleurs, la signalisation de TGF- β est requise pour l'expression de RORc, l'équivalent chez l'homme de ROR γ t de la souris⁶¹.

Le choix de la différenciation en Treg ou Th17 est crucial dans un nombre de maladies. Par exemple, les cellules Th17 jouent un rôle important dans la défense de l'hôte face aux infections fongiques et aux tumeurs⁶². Par contre, elles jouent un rôle aggravant dans les maladies auto-immunes⁶³⁻⁶⁵. Par opposition, les Tregs sont synonymes de mauvais pronostic dans les cas de cancers et de persistance antigénique chez les patients atteints

d'infection chroniques⁶⁶⁻⁷² Ils sont toutefois associés un un meilleur pronostic dans le cas des maladies auto-immunes.

Plasticité cellulaire

D'autres facteurs peuvent intervenir et favoriser le développement d'un type cellulaire au détriment d'un autre. En effet, une fois engagée dans la différenciation, rien n'empêche les cellules T de revenir en arrière, ceci par des facteurs épigénétiques. En effet, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 favorise l'expression des gènes situés sur ce locus. Par opposition, la tryméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 inhibe l'expression des gènes situés à ce locus. Ainsi, le locus des gènes responsables du développement des cellules T auxiliaires (t-bet, GATA3 et RORc) sont méthylés de manière bivalentes, ce qui permet aux cellules T de changer de fonction selon les conditions⁷³. Le même mécanisme est également retrouvé chez les Tregs et les cellules Th17. Pour les Tregs, il existe une différence entre les Tregs dits « naturels » provenant du thymus et ceux différenciés en périphérie. La différence entre ces deux types cellulaire sera discutée au chapitre suivant dans cette revue de littérature. En effet, bien que les deux types cellulaires, dans des conditions non polarisatrices, possèdent un état de méthylation identique au niveau de gènes codant pour la différenciation en Th1 et Th17, les Tregs naturels possèdent une région promotrice totalement déméthylée près du gène *foxp3*⁷⁴. Ceci confère aux Tregs une stabilité dans l'expression de ce gène. Ainsi, lors que mis en conditions polarisatrices, les Tregs conservent l'expression de FOXP3 alors que les Tregs induits en périphérie peuvent perdre cette expression et arborer un phénotype inflammatoire⁷⁴. De manière intéressante, l'inhibition de la méthylation de l'ADN confère aux Tregs induits en périphérie une expression stable de FOXP3⁷⁵. Bref plusieurs facteurs peuvent influencer la différenciation périphérique des cellules T. Ces facteurs proviennent du milieu, mais également de la cellule elle-même. Maintenant, nous allons regarder de manière plus approfondie un de ces types cellulaires qui sera rencontré tout au long de cette thèse : les cellules T régulatrices.

4. Les cellules T régulatrices (Tregs)

L'état de tolérance périphérique représente le résultat de plusieurs mécanismes par lesquels une réponse immunitaire excessive peut être contenue. Les principaux mécanismes amenant à la tolérance périphérique consistent en l'ignorance, l'anergie, la délétion clonale et le contrôle par les cellules T régulatrices (Tregs). Le concept de Tregs a été présenté dans les années 70. Les Tregs étaient alors identifiées sous le nom de cellules T suppressives mais l'absence de marqueurs exclusifs en a limité l'étude au point où leur existence a été sévèrement mis en doute et même éliminée de l'univers immunologique jusqu'à récemment. En 1995, Sakaguchi et al ont démontré que les cellules T exprimant la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) sur les cellules T CD4+, possédaient un effet suppressif sur la réponse immunitaire⁷⁶. Toutefois, lors de l'activation, les cellules T effectrices expriment de manière transitoire CD25, limitant le potentiel de ce marqueur. Ce n'est que lorsque des travaux chez la souris ont par la suite permis d'identifier l'expression de FoxP3 comme facteur discriminant les Tregs des cellules T activées que l'étude de ces cellules a repris et cela de façon très active^{77;78}.

Les Tregs sont très importantes dans le contrôle de la réponse immunitaire. En effet, une mutation dans le gène FoxP3 est associée à un syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (IPEX)⁷⁹. Une perte de leur efficacité ou une diminution de leur nombre peut entraîner des maladies auto-immunes. De plus, les cellules T régulatrices jouent un rôle protecteur dans pathophysiologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) ainsi que dans plusieurs maladies auto-immunes telles le diabète de type 1, la maladie de Crohn, les colites ulcéreuses, l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque. Elles jouent également un rôle aggravant dans la pathophysiologie de plusieurs types de tumeurs et dans la persistance antigénique.

Par la suite, d'autres études ont démontré que les Tregs pouvaient provenir du thymus et posséder un TCR réagissant aux antigènes du soi⁸⁰ ou être induits à partir de cellules T effectrices en périphérie par divers mécanismes⁸¹. De plus, d'autres types de cellules T n'exprimant pas FoxP3 pouvaient avoir un effet suppressif sur la réponse

immunitaire. Dans le texte qui suit, nous décrirons les différents types de cellules T régulatrices chez l'homme et les différentes approches permettant de les distinguer des cellules effectrices activées. Nous terminerons en discutant des différences fondamentales entre les Tregs humains et murins.

4.1. Treg CD4+CD25+FoxP3+

Les Tregs exprimant à la fois CD4, CD25 et FoxP3 sont de loin le type de Tregs le plus étudié. Toutefois, chez l'homme, il s'avère que FoxP3 n'est pas un marqueur exclusif aux Tregs, puisque les cellules T effectrices peuvent exprimer FoxP3 de manière transitoire lors de leur activation^{82;83}. Plusieurs autres marqueurs ont été utilisés pour identifier les Tregs tels l'absence de CD127 (perte aussi observée lors de l'activation des cellules T) et plus récemment, l'absence de CD49d⁸⁴. Certaines études ont également démontré la présence de cellules CD4+CD25-FoxP3+. Par contre, ces cellules ont une efficacité limitée et une déficience de production du facteur anti-apoptotique Bcl-2, ce qui leur donne une plus grande fragilité⁸⁵. En effet, ces cellules sont retrouvées en grand nombre lors des cas de diabète de type 1 avancé et sont associées à une augmentation de la réponse auto-réactive⁸⁵.

4.1.2 Développement thymique des Tregs

Les cellules T régulatrices peuvent provenir soit du thymus ou en périphérie. Les cellules provenant du thymus sont dites Tregs naturels (nTregs) et ceux produits en périphérie sont dits Tregs induits (iTregs).

Les Tregs provenant du thymus émergent parmi les cellules possédant une haute affinité pour les antigènes du soi. Le développement thymique des Tregs est un processus requérant deux étapes. La première implique une stimulation du TCR ainsi que la molécule de costimulation CD28. Ceci entraîne l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) ainsi qu'un changement de l'état de la chromatine. Suite à la liaison entre le TCR des Tregs et le peptide du soi présenté dans le thymus, un « *enhansosome* » comprenant p65, Smad, NFAT et CREB, mais contrôlé par le facteur de transcription c-Rel se lie à la

région promotrice du gène *foxp3* pour favoriser sa transcription⁸⁶. De manière similaire aux Tregs induits en périphérie, l'activité de Smad et NFAT semblent impliquée dans le développement thymique des Tregs. Cependant, les souris déficientes pour Smad et NFAT n'ont pas de réduction en nombre de Tregs suggérant que toutes les composantes de cet « enhansosome » ne sont pas requis pour le développement des Tregs⁸⁷. Ce premier signal prédispose les cellules à devenir Tregs. Le second signal est indépendant de la liaison au TCR. Il est dépendant de la présence d'IL-2 dont la signalisation entraîne la phosphorylation de STAT5 qui à son tour favorise l'expression de FOXP3⁸⁸.

De manière intéressante, les Tregs possèdent plusieurs récepteurs de la supersfamille du récepteur du TNF- α . Ces récepteurs sont reconnus pour augmenter l'état d'activation des cellules T conventionnelles. Cependant, des études sur un modèle murin démontrent que des stimuli inflammatoires ne produisent pas ces effets chez les Tregs retrouvés dans le thymus⁸⁹. Toutefois, une étude récente a démontré que les cellules stromales ainsi que les APC retrouvées au thymus possèdent les ligands pour ces récepteurs et que la stimulation de ces récepteurs est requise pour le développement des Tregs⁹⁰.

4.1.4 Développement périphérique des Tregs

Outre les Tregs naturels, les Tregs peuvent se développer à partir des cellules T conventionnelles. Le mécanisme de différenciation des Tregs en périphérie diffère de celui retrouvé dans le thymus. En effet, il a récemment été démontré qu'un « enhancer » situé en amont du gène FOXP3, le « conserved non coding sequence 1 » (CNS1) était indispensable pour la différenciation des Tregs en périphérie, mais pas au niveau du thymus démontrant ainsi une disparité entre les mécanismes de différenciation⁹¹. D'ailleurs, certaines bactéries commensales sécrètent des métabolites, des acides gras à courtes chaînes (SCFA) qui permettent la tolérance intestinale à ces bactéries via la CNS1⁹². Comme nous l'avons vu lors de la section précédente, le développement de ces cellules s'apparente au développement des cellules Th17. Dans cette section, nous verrons de manière spécifique le développement périphérique des Tregs.

Comme les Tregs naturelles, les Tregs induits expriment CD4, CD25 ainsi que le facteur de transcription FOXP3. L'induction de CD25 et de FOXP3 s'effectue en périphérie et nécessite une stimulation du TCR. En effet, lors de l'activation de la cellule T, les facteurs de transcription NFAT et AP-1 se lient à la région promotrice de FoxP3 et régulent positivement son expression⁹³. Ces facteurs de transcription sont également exprimés lors de l'activation des cellules T, ce qui peut expliquer l'expression transitoire de FOXP3 par les cellules T activées⁸². Outre la stimulation du TCR, la présence de TGF- β semble aussi jouer un rôle dans l'expression de FoxP3. La signalisation de TGF- β se fait par SMAD3/4 qui est transloqué au noyau et se lie alors à NFAT au site de la région promotrice de FoxP3 pour augmenter son expression^{94;95}. En revanche, FOXP3 diminue l'expression de l'inhibiteur de SMAD3/4 (SMAD7) formant ainsi une boucle de régulation positive favorisant son expression⁹⁶. Toutefois, chez l'homme, les cellules activées en présence de TGF- β n'exercent pas nécessairement une activité régulatrice sur la réponse immunitaire⁹⁷. D'autres études seront nécessaires afin de comprendre par quel mécanisme l'activité régulatrice peut être conférée aux Tregs chez l'homme. Plusieurs autres mécanismes favorisent l'induction de FoxP3 tels qu'une faible signalisation de Notch^{98;99} et la présence d'acide rétinoïque¹⁰⁰.

La présence de certaines cytokines dans le milieu peut moduler l'expression de FoxP3. En effet, la présence d'IL-2 dans le milieu entraîne l'activation de STAT5, qui est essentielle, mais pas suffisante pour entraîner l'expression de FoxP3¹⁰¹⁻¹⁰³. De plus, IL-2 est également importante pour la prolifération et le maintien de la population Treg. En effet, les Tregs sont capables de proliférer en absence de stimulation du TCR en présence d'IL-2¹⁰⁴. Cette capacité permet aux Tregs de survivre et proliférer en présence de certains agents immunosuppresseurs, il en sera question plus loin dans cette revue de littérature.

Contrairement aux Tregs naturels, dont l'expression de FOXP3 est stable, les Tregs induits peuvent perdre l'expression de ce facteur. En effet, la présence d'IL-4, une cytokine anti-inflammatoire, entraîne la phosphorylation de STAT6. Celle-ci peut lier NFAT et NF κ B pour induire l'expression du facteur de transcription GATA3. Ce dernier peut ensuite

se lier au promoteur de FoxP3 et ainsi diminuer son expression¹⁰⁵. Par contre, par un mécanisme encore inconnu, la présence d'IL-4 ne diminue pas l'activité régulatrice des Tregs¹⁰⁶. Quant à la présence d'IL-6 dans le milieu, elle entraîne une phosphorylation de STAT3 qui à son tour augmente l'expression de SMAD7, inhibant ainsi l'induction de FoxP3¹⁰⁷. STAT3 joue cependant un double rôle, puisqu'il est également associé à l'augmentation de la sécrétion de TGF- β et d'IL-10¹⁰⁸. Aussi, la présence d'INF- γ dans le milieu peut influencer l'expression de FoxP3. En effet, la signalisation d'INF- γ est associée à la phosphorylation de STAT1. Ce dernier peut alors diminuer l'expression de FoxP3 soit par liaison directe à sa région promotrice ou par l'augmentation des gènes « *INF reactive factors* » comme IRF1¹⁰⁹. Toutefois, chez la souris, la signalisation de STAT1 entraîne la génération de cellules T régulatrices qui n'expriment pas le facteur de transcription FoxP3. Ce type de Treg sera décrit plus loin dans ce texte.

Comme les cellules T effectrices, les Tregs CD4+CD25+FoxP3+ possèdent des populations naïves et mémoires. Plusieurs marqueurs ont été proposés pour identifier les Tregs mémoires incluant CD39 et CCR6^{110;111} qui peuvent ou non exprimer la molécule du CMH de classe II (HLA-DR). L'activité des Tregs exprimant HLA-DR est caractérisée par l'absence de prolifération lors de la stimulation et par un effet suppresseur immédiat dépendant du contact cellulaire. Celle des Tregs n'exprimant pas HLA-DR est caractérisée une prolifération lors de l'activation et un effet suppresseur atteignant un sommet 4 à 5 jours après l'activation¹¹².

4.1.4 Activité des Tregs

Les Tregs agissent par l'entremise d'une variété de mécanismes. Notamment, plusieurs études ont démontré que les Tregs pouvaient inhiber la réponse immunitaire par la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10^{66;67}, IL-35¹¹³ et TGF- β ^{68;69}. D'autres études ont toutefois démontré que le contact cellulaire était nécessaire à l'activité des Tregs. Ce mécanisme implique CTLA-4 qui peut lier les molécules B7.1 ou B7.2 des cellules présentatrices d'antigène (APCs) et entraîne une production accrue d'indoleamine 2,3

dioxygénase (IDO)¹¹⁴, enzyme responsable du métabolisme du tryptophane. L'action de cet enzyme diminue la quantité de tryptophane disponible et entraîne la mort des cellules T activées ou leur conversion en Tregs¹¹⁵. Les Tregs peuvent aussi interagir directement avec les cellules T activées par plusieurs mécanismes : CTLA-4¹¹⁶, dont le mécanisme moléculaire reste peu connu (inducible cAMP early repressor (ICER) et inhibition d'IL-2¹¹⁷, IDO, LAG3, qui réduit l'état d'activation des cellules T ou encore le transfert d'AMPc par les jonctions « gap » ou par destruction des cellules T activées via perforine/GranzymeB¹¹⁸) (Revue dans^{119;120}). De plus, les Tregs peuvent inhiber l'inflammation grâce à l'expression de CD39 et CD73 qui transforment respectivement l'ATP dans le milieu (signal d'inflammation) en ADP, puis celui-ci en AMP¹²¹. L'hème oxygénase-1 (HO-1), qui dégrade le groupement hème et forme du monoxyde de carbone (CO), a également été associé à l'effet suppresseur des Tregs^{122;123}. Un autre mécanisme propose que la présence de CD25 sur les Tregs leur donne une plus grande affinité pour IL-2 comparativement aux T effecteurs. Les cellules T effectrices peuvent alors être privées d'IL-2 nécessaire à leur activation et à leur prolifération¹²⁴.

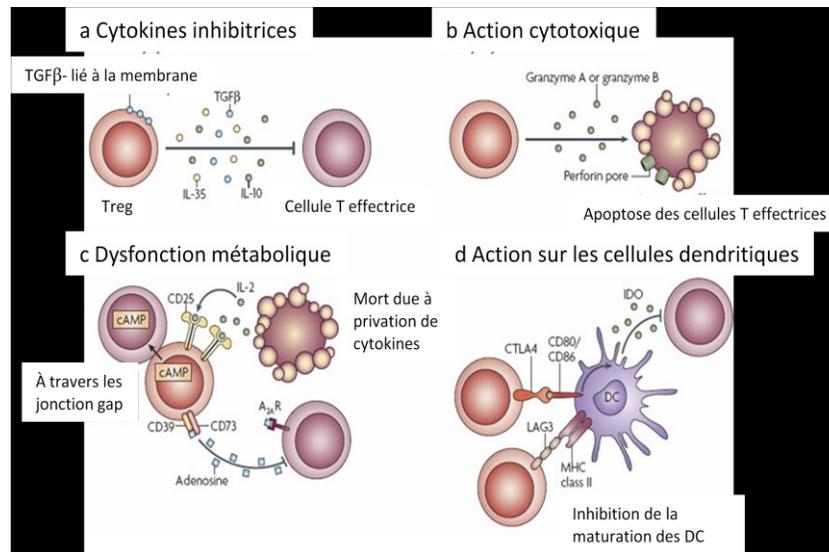


Figure 7 Différents mécanismes d'action des Tregs pour supprimer la réponse immunitaire (Modifié de ¹²⁵)

Il a récemment été démontré que les Tregs peuvent interagir avec les cellules B et moduler la réponse humorale. Premièrement, Cong et al ont démontré dans un modèle murin qu'un haut taux d'IgA dans la muqueuse intestinale inhibait l'absorption de flageline par la muqueuse intestinale et prévenait une activation systémique des cellules T¹²⁶. La déplétion des Tregs entraîne une chute des IgA et une activation systémique des cellules T¹²⁶. De plus, les Tregs peuvent entraîner une augmentation de la sécrétion d'IgG4 par les cellules B au détriment des autres types d'immunoglobulines, notamment IgE^{127;128}. Cette réponse est moins inflammatoire que la réponse aux autres types d'immunoglobulines. Par contre, les IgG4 peuvent être impliquées dans certaines maladies auto-immunes telles les pancréatites auto-immunes où un haut niveau de Tregs et d'IgG4 a été observé¹²⁹.

Bref, le facteur de transcription FoxP3 est un facteur phare pour les Tregs. Cependant, chez l'homme, l'expression seule de FoxP3 n'est pas garante d'une activité régulatrice. Il existe en revanche plusieurs autres types de Tregs n'exprimant pas FoxP3 et exerçant une activité régulatrice.

4.2. Tregs CD4+ FoxP3-

Cette catégorie de Tregs est très hétérogène en terme de population cellulaire et de mécanismes d'action. Ces cellules sont induites suite à la stimulation de cellules T naïves par des cellules dendritiques tolérogéniques. Les Tregs induits sont des cellules anergiques ayant un effet inhibiteur sur la réponse immunitaire. Les cellules de type Th3 représentent un des types de Tregs les plus étudiés. Ces cellules sont souvent confondues avec les cellules CD4+CD25+FoxP3+ car elles peuvent ou non exprimer FoxP3. La différence majeure avec les Tregs conventionnels se retrouve au niveau du mécanisme d'action de ces cellules qui agissent exclusivement par sécrétion ou expression membranaire de TGF- β ^{130;131}. Leur induction est également médiée par la présence de TGF- β ¹³².

Certains Tregs n'expriment pas FoxP3 et agissent quasi exclusivement par sécrétion d'IL-10¹³³. Il s'agit de cellules T régulatrices de type 1 (Tr1). Ces cellules sont induites en présence d'IL-10 et d'une faible présentation antigénique¹³⁴. Elles sont souvent associées à

la persistance antigénique lors des infections microbiennes, et aussi à l'amélioration des maladies auto-immunes et de la GVHD. De plus, elles expriment une grande quantité d'IL10 ainsi que de TGF- β , de l'INF- γ et de l'IL-5¹³⁴. Par contre, elles ne sécrètent pas d'IL-4 ni d'IL-2¹³⁴. Ces cellules peuvent se développer en absence de Tregs conventionnels et inhiber la réponse immunitaire avec la même efficacité que ces derniers. La stimulation de CD46 par la molécule du complément C3b peut également induire des Tr1¹³⁵. Dans les cas de sclérose en plaque où la production d'IL-10 est altérée, beaucoup d'intérêt a été porté à l'étude de la voie du CD46.

Les Tregs exprimant CD4, CD25 et FoxP3, les cellules Th3 ainsi que les Tr1 représentent les populations de Tregs les plus étudiées. Toutefois, il existe d'autres populations capables d'exercer une fonction inhibitrice sur la réponse immunitaire. Skapenko et al ont démontré que les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 pouvaient induire l'expression de FoxP3 chez des cellules T effectrices¹³⁶. Ces cellules démontraient les mêmes fonctions que les Tregs conventionnels¹³⁶. Ces résultats portent toutefois à controverse puisque dans un premier temps, plusieurs autres études ont démontré que l'IL-4 était associé à une inhibition de l'expression de FoxP3. De plus, les cellules étaient cultivées en présence d'APCs. L'effet observé après exposition à l'IL-4 et l'IL-13 aurait alors pu provenir d'une modification au niveau des APCs.

4.3. Les Tregs CD8+

Bien que les Tregs CD4+ soient les cellules suppressives les plus étudiées, ces cellules possèdent un *alter ego* parmi les cellules CD8+. Il existe une grande variété de populations CD8+ ayant une activité inhibitrice. Dans la plupart des cas, ces cellules sont induites par une stimulation répétée par des antigènes du soi ou allogéniques ainsi que par certains peptides viraux et toxines bactériennes^{137;138}. Il existe toutefois un type de Tregs dérivé du thymus. Il s'agit des cellules CD8+ exprimant CD25, CTLA-4, GITR et FoxP3¹³⁹. Ces cellules représentent 0.1 à 1% des cellules CD8 totales. Ces cellules agissent par l'entremise de TGF- β et de CTLA-4¹³⁹. FoxP3 peut également être induit chez les cellules CD8+ sous l'action de stimulations répétées par des APCs autologues (présentant

un peptide du soi)^{140;141}. Contrairement aux Tregs CD4+CD25+FoxP3+ qui peuvent agir par sécrétion de cytokines et par contact cellulaire, les cellules CD8+FoxP3+ agissent exclusivement de manière contact cellulaire-dépendante¹⁴⁰.

Le type de Treg CD8+ le plus étudié chez l'homme concerne les cellules exprimant CD8 sans exprimer la molécule de co-stimulation CD28^{142;143}. Elles peuvent également exprimer FoxP3. Ces cellules agissent particulièrement sur les APCs. L'exposition des APCs aux cellules CD8+CD28- entraîne l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les protéines « *Ig-like transcripts* » (ILT3 et ILT4)¹⁴⁴. Ces protéines font partie de la famille des NK « *inhibitory proteins* » (KIR) et sont associées à l'inhibition du facteur de transcription NF-κB¹⁴⁴. ILT3 inhibe également l'expression des molécules de co-stimulation sur les APCs¹⁴⁵. De plus, il existe un autre type de Treg CD8+CD28- qui exprime également CD56¹⁴⁶. Ces cellules agissent en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 sur les APCs, diminuant la capacité de ces dernières à activer les cellules T¹⁴⁶.

Un autre type de Tregs CD8+ agissant de manière contact cellulaire-dépendante et dont le mécanisme d'action demeure peu connu concerne les cellules CD8+ exprimant CD103¹⁴⁷ ou exprimant CD103 et CD101¹⁴⁸. Ces cellules sont induites à la suite d'une stimulation répétée par un alloantigène¹⁴⁷. Ces cellules semblent particulièrement efficaces pour inhiber la réponse immunitaire au niveau des intestins, puisque CD103 permet aux cellules d'entrer efficacement dans les tissus lymphoïdes intestinaux.

Les cellules Tr1 ont également un *alter ego* chez les cellules CD8+. Effectivement, les cellules dendritiques plasmacytoïdes¹⁴⁹ ainsi que les cellules dendritiques associées aux tumeurs¹⁵⁰ sont capables d'induire l'expression d'IL-10 chez les cellules CD8+^{149;150}. Les cellules dendritiques associées aux tumeurs sont également capables d'induire l'expression de CCR7 sur ces Tregs¹⁵⁰. Ces dernières peuvent alors pénétrer dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur et inhiber la surveillance anti-tumorale.

4.4. Cellules double négatives

Les cellules double négatives représentent environ 1% de la population totale de cellules T et environ 2,5% de la population T dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules favorisent la tolérance à la suite de greffes de cellules souches hématopoïétiques¹⁵¹. Elles exercent également un effet cytotoxique envers les cellules CD4+ et CD8+ congéniques. L'activité cytotoxique requiert un contact cellulaire et se produit par la voie FAS/FASL¹⁵². Cette élimination se fait de manière antigène et dose-dépendante. De plus, Hillhouse et al ont démontré que les cellules T double négatives pouvaient éliminer les cellules B dans un modèle de souris diabétiques¹⁵³. Ces cellules peuvent donc agir sur plusieurs types cellulaires différents et induire la tolérance.

Un autre type de cellules n'exprimant ni CD4 ni CD8 et ayant une fonction inhibitrice sur la réponse T est représenté par les cellules T $\gamma\delta$ de type V δ 1¹⁵⁴. Ces cellules possèdent un TCR constitué des chaînes γ et δ . Elles ne reconnaissent pas l'antigène comme les autres cellules T. En effet, au lieu d'utiliser les molécules du CMH de classe I ou II, ces cellules reconnaissent les molécules reliées aux molécules du CMH MICA/B et « *UL-16 binding protein* » (ULBP) grâce au récepteur NKG2D¹⁵⁵. Il s'avère que ces cellules infiltrent les tumeurs et peuvent à la fois inhiber la réponse T effectrice ainsi que la maturation et la présentation antigénique des cellules dendritiques¹⁵⁴. Le mécanisme d'action de ces cellules demeure peu connu. Il a toutefois été démontré que ces cellules ne sécrètent ni IL-10 ni TGF- β ¹⁵⁴. Quant aux cellules T $\gamma\delta$ de type V γ 4, elles peuvent inhiber la réponse CD8+ par la sécrétion d'IL-10¹⁵⁶.

Bref, les cellules T exerçant une fonction suppressive représentent une population très hétérogène. Les fonctions suppressives de ces cellules peuvent être vérifiées par une variété d'expériences en laboratoire. Nous discuterons donc des différentes stratégies qui peuvent être utilisées pour évaluer la fonction des cellules Tregs.

4.5. Différence entre la souris et l'homme

Le modèle murin est très utilisé dans la recherche immunologique. Il existe toutefois quelques différences fondamentales entre les Tregs humains et murins. En effet, la différence la plus marquante consiste en l'expression de FoxP3 qui n'est pas restreinte au Tregs chez l'homme^{82;157}. Cette observation peut biaiser les résultats de certaines expériences effectuées avec des cellules humaines. Cette différence peut expliquer le fait que plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes sont associés à une réduction du nombre de Tregs exprimant FoxP3 alors que le nombre de cellules FoxP3+ n'est pas réduit chez l'homme. De plus, l'induction de FoxP3 par TGF- β chez la souris est garante d'activité inhibitrice alors qu'elle ne l'est pas chez l'homme⁹⁷. D'autres marqueurs sont exprimés différemment chez la souris et chez l'homme. En effet, l'expression de CD103 et CD101¹⁵⁸ chez la souris est associée à un phénotype *effecteur/mémoire-like* ayant une activité inhibitrice plus grande et offrant une meilleure protection contre la GVHD¹⁵⁹. Par contre, ce phénotype est associé à l'expression de CD39, CCR6 et HLA-DR chez l'homme^{84;110}.

Au niveau des Tregs CD8+, le phénotype des Tregs murins diffère également de celui des Tregs humains. En effet, chez la souris, les cellules Tregs CD8+ provenant du thymus sont caractérisées par l'expression de CD122 et inhibent la réponse immunitaire par la sécrétion d'IL-10¹⁶⁰. De plus, chez la souris, aucune étude ne fait rapport de l'expression de FoxP3 sur les cellules CD8+ provenant du thymus¹⁶¹

Les Tregs humaines et murines exercent une plasticité différente. Effectivement, une population de Tregs CD4+CD25+FOXP3+ humaines (exprimant CCR6, mais pas HLA-DR) et murines, sous l'effet de conditions pro-inflammatoires (IL-6 ou forte stimulation du TCR) peut sécréter IL-17 et perdre sa fonction suppressive^{162;163}. Toutefois, contrairement aux Tregs murines, cette population de Tregs humaines ne perd pas l'expression de FoxP3¹⁶²⁻¹⁶⁴, mais co-exprime FoxP3 et ROR γ t¹⁶². De plus, lorsque les conditions pro-inflammatoires disparaissent, ces Tregs humaines peuvent recouvrer une fonction suppressive¹⁶³, ce qui n'a pas été démontré chez la souris. Ceci peut également

expliquer les différences observées entre les humains et la souris lors du décompte des cellules FoxP3+ dans un contexte de maladies auto-immunes. Cependant, l'expression de FoxP3 ainsi que la fonction suppressive des Tregs peuvent être induites et conservées par une variété de mécanismes.

5. Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO)

Indoleamine 2,3 dioxygénase est un des principaux enzymes responsables de la dégradation du tryptophane. Effectivement, IDO transforme le tryptophane en L-formylkynurenine, ce qui constitue l'étape limitante dans cette dégradation. Cette réaction requiert la présence d'oxygène et la présence d'ions superoxyde augmente l'efficacité de la réaction¹⁶⁵. De plus, la présence d'espèces réactives de l'oxygène favorisent l'induction d'IDO ainsi que son activité¹⁶⁶. Cet enzyme est exprimé principalement par les APC (cellules dendritiques plasmacytoïdes et monocytoïdes ainsi que les monocytes et les macrophages) et certains types de cellules tumorales en réponse à la présence de stimuli inflammatoires tel IFN- γ et anti-inflammatoires tel que CTLA-4¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

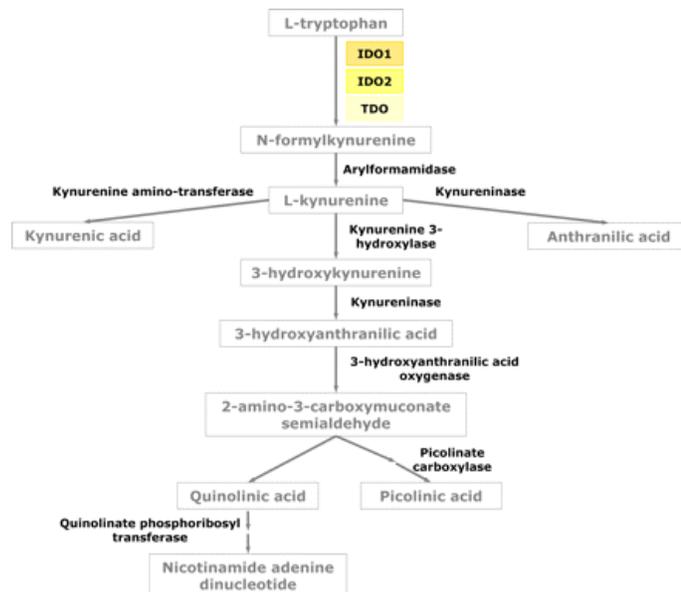


Figure 8 La cascade du catabolisme du tryptophane est initiée par l'enzyme IDO (tiré de¹⁷⁰)

Le rôle immunosuppresseur d'IDO a d'abord été mis en évidence grâce à son rôle dans la tolérance lors de la gestation¹⁷¹. IDO était alors sécrété par les cellules du trophoblaste¹⁷¹. Il a alors été démontré que cette immunosuppression était due à la déplétion du tryptophane¹⁷². L'expression d'IDO a par la suite été découverte dans les cellules dendritiques et les autres APC afin de limiter la prolifération des cellules T¹⁷³. La stimulation d'IDO est utilisée par certains agents infectieux dans le but d'échapper au système immunitaire¹⁷⁴. Il a ensuite été démontré que les cellules tumorales peuvent exprimer IDO afin de contrôler la réponse anti-tumorale. L'inflammation chronique favorisant le développement des tumeurs favorise l'induction d'IDO¹⁷⁵. Il n'est d'ailleurs pas surprenant que l'inhibiteur chimique de IDO, le 1-méthyl-tryptophane (1-MT) s'avère efficace pour augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale^{176;177}. Plusieurs autres traitements anti-cancéreux tels la photophryne et les inhibiteurs de tyrosine kinase possèdent une activité anti-IDO^{178;179}.

La diminution du tryptophane causée par IDO n'est pas sans effet sur les cellules T. D'abord, l'activité d'IDO et des Tregs forme une boucle de rétroaction positive¹⁸⁰. Ceci explique en partie l'effet immunosuppresseur d'IDO sur la réponse T. De plus, la baisse de tryptophane dans le milieu, caractérisée par l'augmentation d'ARN de transfert dépourvu d'acides aminées, entraîne l'expression de la protéine kinase « *general control non repressed 2* » (GCN2)¹⁸¹. GCN2 a pour effet de bloquer le cycle cellulaire des cellules T activées¹⁸¹. En cas de forte diminution du niveau de tryptophane, la cellule peut entrer en apoptose. Plusieurs évidences démontrent que cette apoptose implique le facteur pro apoptotique CHOP¹⁸². L'effet pro apoptotique d'IDO varie selon le type de réponse cellulaire rencontrée. En effet, les cellules Th1 et les thymocytes sont plus sensibles à l'apoptose de manière dépendante de la kynurenine que les cellules Th2¹⁸³.

Il a également été démontré que GCN2 inhibe la différenciation des cellules T en Th17 tout en favorisant leur différenciation en Tregs^{184;185}. Ainsi, IDO permet la différenciation des cellules naïves en nouveaux Tregs^{186; 187}. Le mécanisme moléculaire par lequel GCN2 dans les cellules T favorise le développement des Tregs demeure méconnu. Toutefois, l'expression de GCN2 dans les cellules dendritiques inhibe la sécrétion d'IL-6,

cytokine essentielle à la différenciation des Th17. De manière intéressante, IDO possède également des « *immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs* » (ITIM) lui permettant d'inhiber l'activité d'autres protéines. En effet, IDO peut inhiber l'activité d'IRAK-1, inhibant ainsi la signalisation pro-inflammatoire d'IL-1¹⁸⁸. Cette molécule est d'ailleurs essentielle dans le développement des cellules Th17. À l'opposé, la signalisation d'IL-6 induit l'expression de « *suppressor of cytokine signaling 3* » (SOCS3), qui entraîne la dégradation d'IDO, favorisant ainsi le développement des cellules Th17¹⁸⁹.

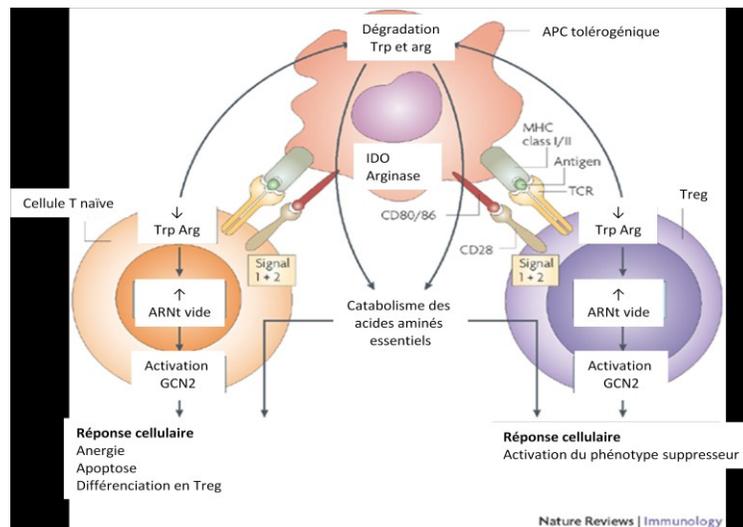


Figure 9 Le catabolisme du tryptophane entraîne des changements dans les cellules T. Le manque d'acides aminés essentiels amène l'activation de la kinase GCN2. Qui peut induire un phénotype Treg dans les cellules T naïves, mais également activer les Tregs. (Modifié de¹⁹⁰)

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

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) est la principale cause de mortalité et de morbidité suite aux greffes de cellules souches. Malgré les avancées thérapeutiques récentes, la majeure partie des patients souffrant d'une forme sévère de GVHD en meurent. Cette maladie fut notée pour la première fois lors d'une expérience chez les rongeurs. Suite à une irradiation létale, les souris ayant reçues une greffe de cellules souches syngénique (provenant de la même souche) recouvraient de la toxicité causée par les radiations¹⁹¹.

Toutefois, les souris ayant reçues une greffe allogénique (de souche différente) et avec une disparité au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ont pu éliminer la leucémie mais certains animaux ont développé une maladie secondaire caractérisée par des diarrhées et une perte de poids¹⁹¹.

Il existe deux formes majeures de GVHD : la forme aiguë (aGVHD), survenant habituellement précocement après la greffe et la plupart du temps dans les premiers 100 jours post-greffe et résultant d'une réaction « rejet » de l'hôte par le greffon, et une forme chronique (cGVHD) qui survient généralement après 100 jours et résultant d'un dysfonctionnement du système immunitaire¹⁹²⁻¹⁹⁴. Ces deux catégories se divisent elles-mêmes en sous-classes. Pour la GVHD aiguë, il y a la forme classique, la forme persistante et la forme tardive¹⁹⁴. La forme classique survient précocement après la greffe et peut atteindre la peau, l'intestin et le foie. La forme persistante se manifeste pour une durée qui va au-delà des 100 premiers jours alors que la forme tardive survient après les 100 premiers jours. Cette dernière est d'ailleurs souvent confondue avec la cGVHD, mais elle ne présente pas de manifestation clinique de la cGVHD¹⁹⁵. Plusieurs facteurs peuvent favoriser le développement de l'aGVHD, dont l'intensité du régime de conditionnement favorisant l'inflammation et l'activation des cellules T ainsi que le degré d'incompatibilité entre le donneur et le receveur. Un donneur femme pour un receveur homme présente un risque accru de développement de l'aGVHD¹⁹⁶. Ceci est dû à la capacité des cellules femelles de reconnaître l'antigène Y exprimé à la surface des cellules mâles pouvant entraîner la GVHD¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Grâce aux avancées dans la prophylaxie, à l'utilisation de régimes de conditionnements réduits et le traitement de la GVHD aiguë, on dénombre ces dernières années une diminution de la forme classique de l'aGVHD et une augmentation de la forme tardive¹⁹⁵.

Pour la GVHD chronique, il y a la forme classique et le « *overlap syndrome* »¹⁹⁴. La forme classique se manifeste après les cent premiers jours alors que les patients atteints de l'« *overlap syndrome* » (symptômes de la GVHD aiguë et chronique simultanément) peuvent démontrer des symptômes avant la limite relative¹⁹⁴. Chez ces derniers patients les

caractéristiques d'une aGVHD surviennent souvent lors d'une seconde allogreffe de cellules souches hématopoïétiques¹⁹⁴. La cGVHD touche environ 60-70% des patients recevant une alloHSCT. De plus, les symptômes et la gravité de celle-ci varie selon différents facteurs dont l'âge, le sexe (féminin) des donneurs et des receveurs et le degré d'appariement entre les récepteurs des lymphocytes T et ceux des APCs. La cGVHD ressemble davantage à une maladie auto-immune, mais les auto-anticorps produits ne sont pas reliés à un organe spécifique. Les symptômes d'inflammation et de rejet de la forme classique se situent surtout au niveau de la peau et du foie. La forme du « *overlap syndrome* » est présente sur un plus grand nombre d'organes dont la peau, le foie, les yeux, le tube digestif, les glandes salivaires et plusieurs autres¹⁹⁴. C'est cette caractéristique qui la différencie de l'aGVHD. Cependant, la peau reste l'organe le plus touché par la cGVHD¹⁹⁴. Lors du développement de la maladie, il se forme des plaques rouges en surface avec atrophie de l'épiderme selon le stade de progression de la maladie¹⁹⁴. De plus, il a été démontré que les patients atteints de cGVHD classique répondent mieux aux traitements que ceux atteints de GVHD aigue tardive²⁰⁰.

6.1. GVHD aigüe

6.1.1. Manifestation cliniques et histologiques

Les principaux tissus touchés par la GVHD aiguë sont la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal. La sévérité de la GVHD est classée en grades de 0 à IV pour chaque organe touché selon une charte établie (Voir Tableau1).

Grade de la GVHD aigue	Peau	Foie	Intestin	Performance clinique
I	Rash < 25% de la surface du corps	Bilirubine sérique < 2mg/dl	Absence de diarrhée	Bonne
II	25-50% de la surface du corps	3,1 – 6 mg/dl	Diarrhée > 500 mL	Légèrement diminuée
III	> 50% de la surface du corps ou érythème diffus	6,1 – 15 mg/dl	>1000 mL	Diminuée
IV	Bullae, desquamation	> 6,1 mg/dl	>1000 mL	Sévèrement diminuée

Tableau 1 Gradation de la GVHD aigue selon les organes touchés.

6.1.2. Physiopathologie

La GVHD aiguë comprend trois phases. Une première phase de conditionnement, est suivie d'une phase d'activation des lymphocytes T et d'une phase inflammatoire effectrice²⁰¹⁻²⁰⁴ (Voir Figure 10).

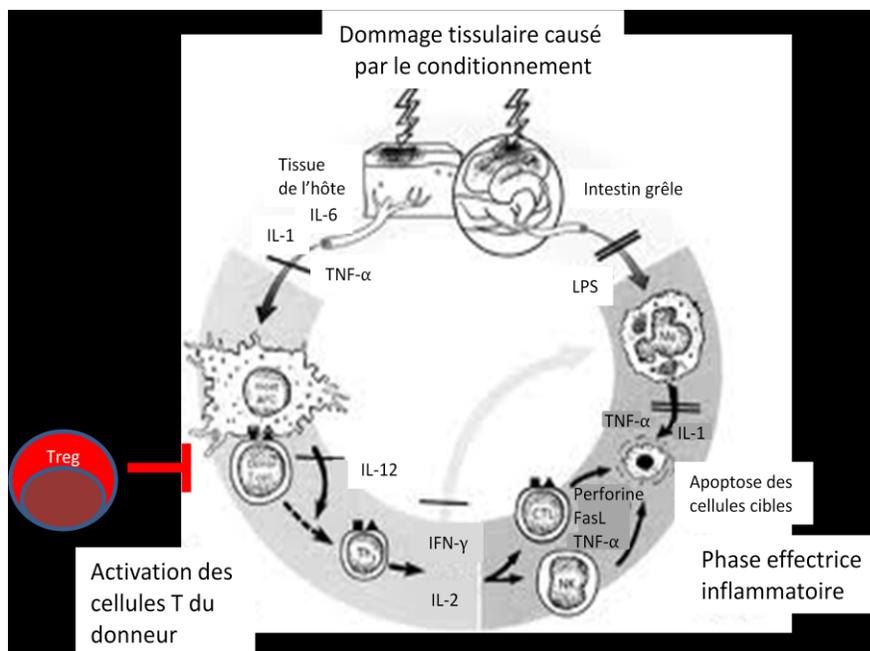


Figure 10 Pathophysiologie de la GVHD aigue. Modifié de ²⁰¹

Phase I : conditionnement

L'étape de conditionnement consiste au traitement que doit subir le patient avant le greffe (radiothérapie et chimiothérapie). Dans environ 50% des cas, le conditionnement est un traitement myéloablatif et immunosuppresseur²⁰². Le conditionnement a pour but de détruire la moelle osseuse atteinte du patient pour permettre au greffon de s'y implanter, d'éradiquer le clone malin et d'induire une immunosuppression afin d'assurer la prise du greffon et d'éviter son rejet^{202;205}. La fréquence de la GVHD est proportionnelle à l'intensité du conditionnement²⁰⁶.

Ce traitement n'est pas seulement dommageable pour les cellules de la moelle osseuse. En effet, il induit entre autres un dommage tissulaire au niveau de l'épithélium du tractus gastrointestinal²⁰⁷. Ce dommage amène une activation des cellules de l'hôte entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-1²⁰⁸, INF- γ et GM-CSF²⁰⁹. Le TNF- α contribue également au dommage en affectant l'intégrité de la

muqueuse²⁰⁴. La présence de ces cytokines a aussi pour effet d'augmenter l'expression des molécules du CMH et autres molécules de co-stimulation sur les cellules dendritiques de l'hôte, augmentant ainsi la présentation d'antigènes du soi²⁰³. Cela a aussi pour effet de faciliter la reconnaissance de l'alloantigène par les lymphocytes T du donneur²⁰⁶. Le dommage au tractus gastro-intestinal permet également à des molécules immunostimulantes d'origine microbienne telles que le lipopolysaccharine (LPS) d'entrer dans la circulation systémique, ce qui a pour impact d'amplifier la réaction inflammatoire²¹⁰. Ces signaux de danger exprimés dans les tissus de l'hôte ont pour effet d'amener l'activation des cellules dendritiques nécessaires pour la réponse immunitaire.²¹¹

Pour l'autre 50% des patients greffés, le conditionnement est dit non-myéloablatif. C'est-à-dire qu'il ne détruit pas entièrement la moelle osseuse, réduisant ainsi l'inflammation secondaire. Ceci a pour effet de réduire considérablement l'incidence de GVHD. Par contre, dans ces cas-ci, les risques de rechutes sont plus importants. Cependant, bien que les risques d'aGVHD classique diminuent, en partie dû à une faible sécrétion de TNF- α , le risque de GVHD tardive persiste²¹². Bref, le conditionnement est une étape importante de la pathophysiologie de la GVHD. Par contre, chez l'homme, la GVHD peut survenir même en absence de régime de conditionnement²¹³. Ceci suggère que même si le conditionnement est un facteur favorisant grandement le développement de la GVHD, il n'est pas requis pour le développement de la GVHD.

Phase II : activation des lymphocytes T

Cette phase correspond à la mise en place de la réponse immunitaire et dépend de l'interaction entre les APCs de l'hôte et les lymphocytes T du donneur. Cette interaction a

généralement lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. L'interaction d'un lymphocyte T et d'un antigène initie une cascade d'évènements biochimiques qui favorise l'activation des lymphocytes T au repos. Les lymphocytes T activés progressent dans le cycle cellulaire pour devenir des lymphocytes T effecteurs ou lymphocytes T mémoires²¹⁴. Pour permettre l'activation des lymphocytes T, un signal de co-stimulation est nécessaire^{203;215}. Les principales molécules de co-stimulation sont CD40L, CD28, LFA-1, LFA-2, CD44 et CTLA-4²⁰². Toutefois, le principal signal de co-stimulation est la liaison entre la molécule B7 de l'APC et le CD28 ou le CTLA-4 du lymphocyte T. CD28 induit un signal positif de la GVHD. En son absence, les lymphocytes T du donneur deviendront anergiques²¹⁶ (leur fonction sera neutralisée). Le CTLA-4 est un régulateur négatif de l'activation des cellules T. Son absence est synonyme d'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T^{204;209}. Toutefois, les lymphocytes T mémoires sont capables de répondre aux signaux du TCR avec peu ou sans co-stimulation¹⁷.

Le rôle des APC

Les APC jouent un rôle primordial dans le développement de la GVHD, particulièrement les APC de l'hôte. En effet, il a été démontré dans un modèle murin de GVHD que les APC de l'hôte sont suffisantes pour causer la GVHD^{217;218}. Par opposition, les APC du donneur ne peuvent déclencher la GVHD, cependant, elles peuvent exacerber la réponse immunitaire et la maladie²⁰³. Plus récemment, les APC du donneur ont démontré une étonnante capacité à présenter les antigènes de l'hôte de façon croisée et à être associées à la GVHD. Parmi les APC, les cellules dendritiques sont les plus puissantes et ont un rôle reconnu dans l'induction de la GVHD²¹⁸. Au niveau de la peau, les APC les plus retrouvées sont les cellules de Langerhans²¹⁹. Des études chez la souris ont démontré que la déplétion de ces cellules chez l'hôte et leur remplacement par des cellules dérivées

du donneur permet de prévenir la GVHD au niveau de la peau lorsque les lymphocytes T du donneur sont injectés au moment de la greffe²²⁰.

Dans un premier temps, les APC sont activées par les facteurs inflammatoires soit d'origine microbienne ou relâchés par les cellules nécrotiques tuées lors de la phase de conditionnement^{211;221}. La présence de ces facteurs a pour effet d'induire la maturation et l'activation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques ainsi activées peuvent à leur tour activer les lymphocytes T du donneur et initier la GVHD. Inversement, dans un état immature, les cellules dendritiques favorisent la tolérance^{203;211}. Une grande majorité des APC seront éliminés par les cellules T du donneur. D'ailleurs, un taux diminué de cellules dendritiques, surtout des cellules dendritiques plasmacytoïdes est une caractéristique de l'aGVHD^{222;223}. Toutefois, dans les cas où un régime de conditionnement réduit est utilisé, les APC de l'hôte persistent. En raison du conditionnement réduit, ces cellules sont dans un état d'activation réduit, sécrètent peu de TNF- α et favorisent la différenciation des Tregs en périphérie²¹². Ceci a pour effet d'inhiber le développement de l'aGVHD. Toutefois, au fur et à mesure de la prise de greffe, une augmentation des cellules dendritiques activées provenant du donneur est observée²¹². Les APC de l'hôte seraient alors capables d'induire cette inflammation nécessaire au déclenchement de l'aGVHD tardive^{212;224}.

Les cellules B sont également capables de présenter les antigènes aux cellules T. Leur rôle dans la pathophysiologie de la GVHD reste cependant peu connu. De récentes études chez la souris et chez l'homme ont démontré que la déplétion des cellules B par un anticorps monoclonal (rituximab) entraînait une diminution de la sévérité et de la mortalité de la GVHD²²⁵⁻²²⁷. Par contre, il a également été démontré que les cellules B pouvaient sécréter de l'IL-10, une cytokine inhibitrice de la GVHD^{228;229}. De plus, une étude effectuée par Michonneau et al a démontré qu'un haut taux de progéniteurs B était associé à une diminution de la GVHD²³⁰. Bref, les cellules B jouent un rôle dans le développement de la GVHD aigue par leur capacité à présenter l'antigène aux cellules T mais peuvent induire la tolérance par leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires.

Le « cytokine storm »

L'activation des lymphocytes T découlant de la présentation de l'alloantigène entraîne des changements biochimiques importants dans la cellule. Parmi ces changements, figure l'activation de la transcription de gènes codant pour des cytokines et leurs récepteurs²³¹. Ce phénomène se nomme « *cytokine storm* » ou tempête cytokinienne. Cette tempête implique plusieurs cytokines telles l'IL-12, l'IL-2, l'IFN- γ , l'IL-15 et l'IL-18²⁰³. Le principal effet du « *cytokine storm* » sont d'amplifier la réaction inflammatoire. Cette réaction résulte en la différenciation des cellules T CD4 du donneur en cellules de type Th1.

La tempête cytokinienne a pour effet de favoriser une réponse inflammatoire de type Th1. Même s'il est convenu que l'aGVHD est médiée principalement par la réponse Th1, il existe une controverse par rapport au rôle de l'IFN- γ dans la pathophysiologie de la maladie. En effet, bien que le taux sérique d'IFN- γ corrèle avec la sévérité de la GVHD chez les patients greffés²³², il a été démontré dans un modèle murin que l'injection de cellules T incapables de sécréter de l'IFN- γ exacerbait la GVHD²³³. Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses : Il est possible que le nombre de cellules exprimant IFN- γ ne soit en réalité que le reflet de l'activation cellulaire et non d'une polarisation vers un phénotype Th1. Toutefois, il est également acquis qu'une réponse Th1 dans les premiers jours suivant une greffe de cellules souches hématopoïétiques était associée à une baisse du risque de développer une GVHD²⁰³. Une autre possibilité est que la sécrétion d'IFN- γ entraîne la production d'IDO au niveau du tissu cible, entraînant une anergie des cellules T, ce qui a été démontré dans la GVHD au niveau du colon²³⁴. Toutefois, IDO semble jouer un rôle mineur au niveau de la peau²³⁵. Ceci peut être expliqué par le fait que la pathophysiologie de la GVHD peut changer selon l'organe cible. En effet, alors que les cellules Th1 semblent impliquées dans la GVHD au niveau du colon, la réponse Th2 et Th17 est impliquée au

niveau de la peau et du foie^{236;237}. D'ailleurs, Xu et al démontre que le taux d'IDO corrèle avec le taux d'IFN- γ et la sévérité de la GVHD²³². Toutefois, aucun organe spécifique n'est donné dans cette étude. Il est donc possible que l'IFN- γ puisse induire IDO afin d'induire l'anergie des cellules T et que dans le cas des aGVHD sévères, l'action d'IDO soit insuffisante pour contrôler l'inflammation. Bref, bien que le rôle d'IFN- γ soit controversé, plusieurs évidences pointent vers un rôle important de la réponse Th1 dans le développement de l'aGVHD.

Rôle des cellules NK

Durant la phase d'activation des lymphocytes T, les cellules NK, tant du donneur que de l'hôte, jouent un rôle inhibiteur de la GVHD. Une étude effectuée chez les rats confirme que la déplétion des cellules NK de l'hôte au moment de la greffe diminue significativement sa survie²³⁸. Cette augmentation de survie est due à la capacité des cellules NK de l'hôte de rejeter les lymphocytes et les cellules de la moelle osseuse du donneur²³⁹. Ces cellules peuvent cependant mener à un rejet de la greffe²⁴⁰.

Les cellules NK du donneur jouent aussi un rôle inhibiteur à cette phase de la GVHD. Ce rôle leur est attribué par leur capacité d'éliminer les APC de l'hôte²⁴¹ responsables de la GVHD et par la sécrétion de TNF- β ²⁴²

Phase III : Phase effectrice cellulaire et inflammatoire

La phase effectrice cellulaire et inflammatoire est une cascade complexe médiée par les lymphocytes T cytotoxiques et par des agents inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 et le NO^{203;243}. Il s'agit d'un ensemble de mécanismes complexes entraînant les lésions aux tissus et organes cibles^{202;244}.

Phase effectrice cellulaire

Les principaux effecteurs cellulaires de la GVHD sont les lymphocytes T cytotoxiques²⁴³. Les voies les plus utilisées pour amener la mort cellulaire des tissus cibles sont les voies Fas/FasL et perforine/granzyme²⁴⁵⁻²⁴⁷. La transplantation de cellules déficientes en perforine entraîne un délai dans l'induction de la GVHD, mais l'apparition de signes histologiques et de mortalité survient même en absence de cette voie²⁴⁸. L'importance de la voie perforine/granzyme est notable surtout chez les lymphocytes T CD8+. D'ailleurs, leur déficience diminue beaucoup la mortalité causée par ce type de cellules. Cette voie est moins importante chez les lymphocytes T CD4+ dont la voie préconisée est celle du Fas/FasL^{203;249}. De plus, la plupart des études n'ont pas permis de démontrer le rôle de la voie perforine/granzyme dans la pathologie des tissus cibles lors de la GVHD^{203;250}.

La cytotoxicité due à la voie Fas/FasL est particulièrement importante dans la physiopathologie de la GVHD. Le nombre de lymphocytes T déficients en FasL est remarquablement diminué dans le foie, la peau et les organes lymphoïdes des patients atteints de GVHD^{203;250}. De plus, l'augmentation de l'expression de Fas dans les voies biliaires²⁵¹ ainsi que le taux sérique élevé de FasL et Fas chez les patients²⁵² démontrent l'importance de cette voie dans la physiopathologie de la GVHD. Toutefois, la voie Fas/FasL est également essentielle pour la survie à long terme du greffon. Une première hypothèse stipulait que la tolérance au greffon est simplement due à l'absence de la voie de co-stimulation CD28/B7²⁵³. Cependant, il est démontré que l'infusion d'un greffon mutant en FasL avait une durée de vie beaucoup plus courte qu'un greffon de type sauvage²⁵⁴. Cette voie est nécessaire pour prévenir la résistance de l'hôte au greffon^{255;256}. Cela corrobore une autre hypothèse stipulant que les cellules de l'hôte réagissant contre le greffon peuvent subir une apoptose médiée par la voie Fas/FasL qui permet ainsi la survie à long terme du greffon^{254;257}.

Une première étude a démontré que, chez des souris irradiées à des doses sub-létales, l'infusion d'un greffon doublement déficient en perforine/granzyme et en Fas/FasL

était incapable d'induire la GVHD²⁵⁸. Toutefois, chez des souris irradiées létalement, aucune différence de mortalité ne fut observée entre les souris recevant des greffons doubles négatifs et de type sauvage.²⁵⁵. Cela indique l'existence d'autres voies effectrices cellulaires dans la physiopathologie de la GVHD aiguë.

Les effecteurs inflammatoires

Les cytokines inflammatoires TNF- α et IL-1 sont sécrétées par les monocytes, les macrophages ou par les autres APC²¹. Leur libération peut provenir de l'interaction du LPS ou d'autres composés d'origine microbienne introduits dans la circulation systémique lors du régime de conditionnement du patient avec les récepteurs toll-like (TLR) de ces cellules^{203;210;259}. Une autre source de cytokines pro-inflammatoires lors de la phase effectrice de la GVHD sont les cellules mononucléées^{203;243}.

Rôle du TNF- α

Le TNF- α joue un rôle important dans la physiopathologie de la GVHD aiguë^{203;243;260-263}. Le TNF- α peut être sécrété par les cellules de l'hôte ou du donneur^{264;265} en réponse aux substances pro-inflammatoires retrouvées dans la circulation systémique. Le niveau de la réponse de TNF- α des cellules du donneur au LPS est une bonne indication de la sévérité de la GVHD²⁶⁶.

Lors de la GVHD aiguë, le TNF- α peut également jouer un rôle en affectant directement l'intégrité des jonctions serrées des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale^{204;267}. Cela a pour effet d'augmenter la perméabilité du colon et d'amener une perte en eau et en ions²⁶⁷. Cet effet peut aussi être dû à l'induction de prostaglandine E causée par l'activité de TNF- α ²⁶⁸. L'augmentation du niveau de TNF- α perturbe aussi la contraction des muscles cholinergiques et augmente le transport des électrolytes au niveau

du colon²⁶⁹. L'augmentation de la perméabilité intestinale permet une plus grande translocation de produits microbiens dans la circulation systémique²⁰⁴.

L'implication du TNF- α dans la physiopathologie de la GVHD se déroule en trois étapes. Premièrement, le TNF- α active les cellules dendritiques et augmente la présentation d'antigènes. Ensuite, il recrute d'autres lymphocytes T effecteurs, des neutrophiles et des monocytes vers les tissus cibles par l'induction de chimiokines pro-inflammatoires. Finalement, le TNF- α cause un dommage direct aux tissus cibles en induisant de l'apoptose et de la nécrose^{203;210;243;270}. L'apoptose est principalement due à l'activation de la voie TNF- α -Fas²⁷⁰. De plus, le TNF- α augmente la sévérité de la GVHD dans le tractus gastro-intestinal en augmentant la libération de cytokines de type Th1²⁷¹. Le blocage du TNF- α par un anticorps monoclonal permet également de diminuer la sévérité de la GVHD²⁷². De plus, une étude récente démontre que le TNF- α augmente la prolifération des lymphocytes CD4+ alloréactifs, la production d'INF- γ et l'intensité de la GVHD au niveau du tractus gastro-intestinal²⁷³.

Le TNF- α semble également jouer un rôle dans l'atteinte hépatique de la GVHD. En effet, une étude récente démontre que le blocage de TNF- α permet de diminuer l'inflammation lobulaire, le nombre de lymphocytes T CD8+ et la production d'INF- γ dans un modèle murin d'incompatibilité au niveau du CMH I²⁷⁴. Toutefois, d'autres études, effectuées sur un modèle d'incompatibilité du CMH I et du CMH II, démontrent une amélioration de la GVHD intestinale, mais pas de la GVHD hépatique à la suite du blocage de TNF- α ^{275;276}.

Autres effecteurs

La deuxième cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la GVHD aiguë est l'IL-1. Lors de la phase effectrice, IL-1 est surtout

sécrété dans les organes lymphoïdes et au niveau de la peau²⁷⁷. L'injection d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 permet de diminuer la mortalité de la GVHD chez les animaux^{278;279}. Toutefois, une étude effectuée chez l'humain ne démontre aucun effet de cet antagoniste sur la GVHD aiguë²⁸⁰. IL-1 pourrait donc avoir un rôle redondant et pléiotropique dans la maladie et agir en synergie avec TNF- α ²⁰³.

L'oxyde nitrique (NO) joue également un rôle dans la physiopathologie de la GVHD. En effet, l'augmentation du taux sérique de NO précède généralement les symptômes de la GVHD²⁸¹. Le NO induit également une relâche de fer de la part des cellules cibles inhibant la prolifération des cellules souches de la peau et de la muqueuse intestinale²⁸². Le NO empêche donc la guérison des tissus atteints par la GVHD.

Bref, la GVHD est une maladie complexe entraînant un cercle vicieux de l'amplification des effecteurs inflammatoires. Lors des manifestations cliniques de la maladie, les lymphocytes T régulateurs, qui d'ordinaire protègent l'organisme contre les manifestations auto et allo-immunes, ne sont pas en nombre suffisant pour faire face à l'inflammation. Les effecteurs de la GVHD n'ont pas tous le même impact dans chaque organe cible. C'est pourquoi cette maladie possède plusieurs facettes selon l'organe touché.

6.1.3. Les Tregs dans la GVHD aiguë

Les Tregs jouent un rôle important dans la prévention de l'aGVHD, permettant de diminuer la sévérité de la GVHD tout en préservant la réaction GVL dans un modèle murin²⁸³. Les Tregs peuvent inhiber l'activation, la différenciation et la prolifération des cellules T lors du « *cytokine storm* » et ainsi prévenir le développement de la GVHD²⁸⁴. De plus, le blocage des molécules effectrices de Tregs est associé à une accélération de la progression de la GVHD. Les Tregs capables de supprimer la réaction du greffon contre

l'hôte peuvent provenir soit du receveur ou du donneur. En effet des études effectuées dans un modèle murin ont permis de déterminer que deux semaines après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, entre 80 et 90% des Tregs sont dérivées du donneur²⁸⁵. Ces Tregs sont spécifiques aux antigènes du donneur et permettent la prise du greffon du donneur seulement²⁸⁵. Les Tregs issues du receveur sont présentes pour favoriser la prise de greffe et prévenir la GVHD. Elles jouent un rôle primordial dans les premières semaines suite à la greffe. De leur côté, les Tregs issues du donneur sont plus efficaces pour inhiber l'alloréactivité des cellules T²⁸⁶⁻²⁸⁸. Elles favorisent également une meilleure reconstitution immunitaire²⁸⁸. Bref, les Tregs, peu importe leur origine favorisent la prise de greffe et favorisent la tolérance du greffon devant l'hôte²⁸⁹. Les Tregs du receveur joueront leur rôle dans les premiers temps jusqu'à l'arrivée des Tregs du donneur. Ces Tregs peuvent soit provenir du thymus ou être induites en périphérie par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Cependant, dans le cas des transplantations humaines chez l'adulte, où le thymus a une fonctionnalité diminuée, il est plus probable que ces Tregs soient induites par les pDC. Ces cellules peuvent induire un phénotype Treg dans les cellules T conventionnelles²⁸⁹. Ceci se produit soit par contact direct dans les ganglions lymphatiques ou par l'expression d'IDO, que ce soit en réponse à un taux d'IFN élevé ou à la signalisation de CD80 suite à sa liaison avec CTLA-4 exprimé par les Tregs eux-mêmes^{168;180;289}. Bref, les Tregs peuvent favoriser l'induction d'un plus grand nombre de Tregs en interagissant avec les pDC.

De manière concordante avec ce rôle, l'aGVHD est caractérisée par une déficience en reconstitution des Tregs suite à la greffe de cellules souches. Il a été démontré qu'un niveau faible de Tregs lors d'une infusion de lymphocytes du donneur était associé à une GVHD forte²⁹⁰ alors qu'un haut taux de Tregs est associé à un faible taux de GVHD^{291;292}. Plusieurs études utilisent d'ailleurs les Tregs comme biomarqueurs du pronostic de la GVHD^{291;293;294}. De manière similaire, un bas taux de pDC est également associé à la GVHD aiguë²⁹⁵⁻²⁹⁷. Un constat similaire a été effectué avec d'autres types d'APC capable

d'induire le phénotype Treg tel les cellules de Langherans dans les cas de GVHD au niveau de la peau^{298;299}.

Par contre, Roswaig et al ont démontré qu'un taux de Tregs élevé dans le greffon ne corrèle pas nécessairement avec l'absence de GVHD³⁰⁰. Cette même étude a cependant établi une relation inverse entre la sévérité de la GVHD et les marqueurs de localisation tissulaire des Tregs tels que les « *cutaneous lymphocyte-associated antigens* » (CLA) pour la peau et l'intégrine $\alpha(4)\beta(7)$ pour l'intestin³⁰⁰. Une autre étude observe une expression réduite de granzyme A ainsi que des récepteurs de chimiokines dans les Tregs des Tregs de patients souffrant d'aGVHD³⁰¹. Ainsi, outre leur nombre réduit, un défaut dans leur capacité de localisation ainsi que dans leur état fonctionnel pourraient expliquer le rôle des Tregs dans le développement de l'aGVHD.

Grâce à leur capacité d'inhibition de la GVHD, plusieurs stratégies impliquant les Tregs ont été étudiées afin de traiter la GVHD. Ceci sera discuté dans la section « Traitements de la GVHD » plus loin dans cette revue de la littérature.

6.2 La voie CTLA-4/ IDO dans la GVHD

Plusieurs études établissent le rôle de CTLA-4 en tant que régulateur de l'activation des cellules T dans un contexte de transplantations^{302;303}. Plusieurs stratégies thérapeutiques étudiées dans un modèle murin impliquent le blocage du principal compétiteur de CTLA-4, le CD28, afin d'induire une immunosuppression dépendante de CTLA-4³⁰². Toutefois, le rôle de CTLA-4 en tant qu'inducteur d'IDO dans la protection face à la GVHD n'a pas été étudié en profondeur. Toutefois, dans les transplantations d'organes solides, il est reconnu que le traitement au CTLA-4-Ig (CTLA-4 fusionné à la partie Fc d'un anticorps) induit une tolérance à long terme de manière dépendante à IDO³⁰⁴. Dans la GVHD, l'activité d'IDO corrèle principalement avec le niveau d'IFN- γ ^{305;306}.

Ainsi, l'activité d'IDO se retrouve augmentée dans les cas de GVHD sévères³⁰⁵. Des études effectuées chez la souris démontrent pourtant qu'IDO joue un rôle inhibiteur de l'activité alloréactive des cellules T, puisque les souris déficientes en IDO meurent plus rapidement de GVHD que les souris de type sauvage³⁰⁷. L'effet d'IDO se pourrait donc se faire sentir dans les organes où la réponse primaire serait Th1 dans le tractus gastro-intestinal par exemple. Ceci démontre que bien qu'IDO exerce une fonction inhibitrice sur l'inflammation, son action n'est pas suffisante pour contrôler l'alloréaction dans les cas de GVHD sévère.

7. GVHD chronique (cGVHD)

Contrairement à la GVHD aiguë, la pathophysiologie de la GVHD chronique (cGVHD) demeure peu connue. La cGVHD s'apparenterait plutôt à une dérégulation du système immunitaire qu'au rejet des antigènes de l'hôte. La polarisation de la réponse T CD4 est également différente. Alors que l'aGVHD est due à une principalement à la polarisation Th1, la cGVHD humaine possède une composante Th1, Th2 et Th17^{308;309}. Chez la souris, la cGVHD possède un phénotype principalement Th2, ce qui rend difficile l'étude de cette maladie par des modèles murins^{310;311}. Toutefois, certaines études récentes démontrent un apport de Th1 et Th17 dans la physiopathologie de la maladie au niveau de la peau³⁰⁸ alors qu'au niveau du poumon, la cGVHD semble plutôt médiée par la réponse Th2³¹². De plus, un apport de la réponse Th17 est également retrouvée au niveau du foie³¹³ alors que la GVHD pulmonaire semble causée par une réponse Th2 et Th17³¹⁴. Ces résultats semblent démontrer que la cGVHD possède une physiopathologie distincte dépendamment de l'organe touché.

De plus, plusieurs similarités ont été décrites entre la cGVHD et certaines maladies auto-immunes par exemple, la sécrétion d'auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin ou les antigènes nucléaires, du muscle lisse et du cytosquelette³¹⁵. Ceci implique la

participation d'autres types cellulaires tels que les cellules B dans la pathophysiologie de la maladie.

Le premier facteur de risque dans le développement de la cGVHD est le développement antérieur de l'aGVHD. En effet, seuls 25% des patients n'ayant pas souffert d'aGVHD vont souffrir de cGVHD. Cette proportion monte à 60% pour les patients atteints d'aGVHD de grade I et 80% pour les patients atteints de aGVHD de grade II-IV³¹⁶. Outre la cGVHD classique et le « *overlap syndrome* », la cGVHD peut être catégorisée de 3 manières différentes : la cGVHD dite *de novo*, où la cGVHD apparaît sans qu'il n'y ait eu de aGVHD, la cGVHD dite interrompue, lorsque le patient a subi une aGVHD qui s'est résolue avant l'apparition de la cGVHD, puis la cGVHD progressive, où la aGVHD évolue en cGVHD. Il serait alors possible que la pathophysiologie de ces 3 types de cGVHD diffère. En effet, plusieurs études placent les cGVHD interrompues et progressives comme étant des extensions chroniques de la GVHD aigüe. Ces types de cGVHD ont une physiopathologie ressemblant à l'aGVHD et impliquant un défaut de reconstitution immunitaire alors que la cGVHD *de novo* s'apparente plutôt à une réaction auto-immune impliquant une déficience au niveau du thymus³¹⁷. Ceci contribue aux difficultés associées à l'étude de la cGVHD.

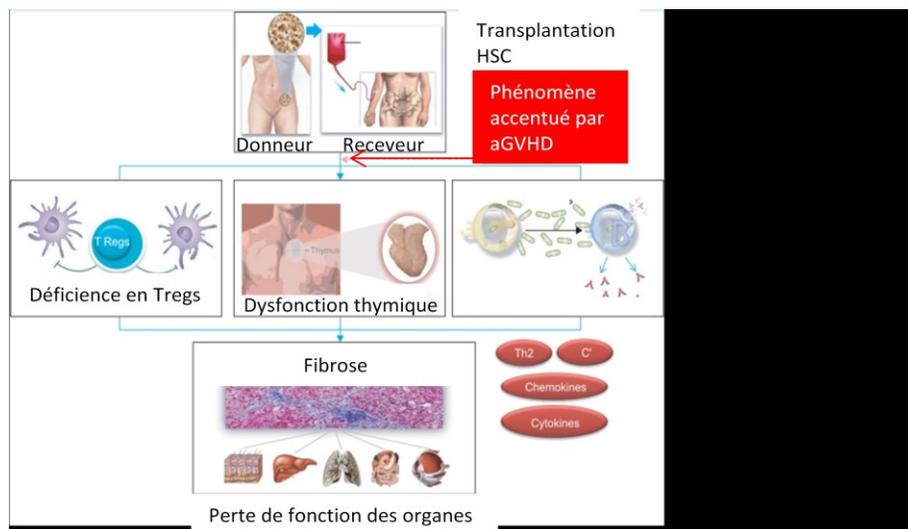


Figure 11 Pathophysiologie de la cGVHD (Modifié de ³¹⁸)

Le second facteur d'importance favorisant l'apparition de la cGVHD est la lymphopénie. D'abord, le régime de conditionnement élimine la majorité des cellules T de l'hôte, ce qui a pour effet d'induire un premier état de lymphopénie chez le patient. De plus, l'involution thymique s'amorçant à l'adolescence n'entraîne pas une limite de la capacité de reconstitution immunitaire du patient. La majeure partie de la reconstitution des cellules T dépend alors de l'expansion homéostatique. Les cytokines IL-7 et IL-15 sont les principales molécules responsables de cette expansion³¹⁹. Il a été démontré que l'IL-7 est responsable principalement de l'expansion des cellules T récemment issues du thymus alors que l'IL-15 est responsable de l'expansion des cellules T mémoires³¹⁹. Il a toutefois été démontré que les cellules T CD4⁺ du sang périphérique ne peuvent s'expanser en réponse à l'IL-7³²⁰⁻³²². De plus, des travaux effectués par Thiant et al ont démontré qu'un taux élevé d'IL-7 chez les patients greffés était associé à une baisse de la population CD3⁺ et que cette baisse est associée à un taux de GVHD plus élevé³²³. Ceci peut également être expliqué par un rôle inhibiteur de la fonction suppressive des Tregs exercé par IL-7³²⁴. Ces résultats impliquent que les cellules T CD4 seront principalement de type mémoire. Le répertoire des cellules T sera alors diminué et dirigé contre les antigènes déjà rencontrés par ces cellules. Ceci aura pour effet d'augmenter à la fois la réponse anti-tumorale, mais aussi la réponse anti-hôte^{325;326}.

Un autre facteur favorisant l'apparition de la cGVHD est la présence d'un agent infectieux. En effet, il a été démontré que certaines cellules T dirigées contre les cellules T pouvaient également réagir contre les antigènes de l'hôte. Une association directe entre les infections au cytomégalovirus (CMV) et l'apparition de la cGVHD a déjà été établie^{327;328}. Un lien avec d'autres agents infectieux et le début de la cGVHD ont également été démontrés^{328;329}. Ces observations concordent avec le « Modèle de danger » proposé par P. Matzinger²¹¹. Ce modèle stipule que, pour que les cellules T réagissent contre un antigène du non-soi, il doit y avoir un signal de danger lié à l'antigène tels que la mort cellulaire par nécrose ou un autre signal créant de l'inflammation²¹¹. Dans le cas de la cGVHD, la

présence de l'agent infectieux pourrait fournir le signal de danger nécessaire à l'activation des cellules T anti-hôtes.

7.1. Les Tregs dans la cGVHD

Alors que plusieurs études ont démontré que les Tregs sont diminuées à la fois lors de l'aGVHD et de la cGVHD, la cinétique de cette population varie selon le type de GVHD rencontrée. En effet, Matsuoka et al a démontré que, lors de la cGVHD, les Tregs prolifèrent d'abord rapidement, permettant de contrer l'aGVHD³³⁰. Toutefois, dans un contexte de lymphopénie sévère, cette prolifération rapide rend les Tregs vulnérables à l'apoptose médiée par la voie Fas/FasL³³⁰. Ceci entraîne une perte subite de cette population, ce qui favorise le développement de la maladie³³⁰. Néanmoins, la quantité de Tregs lors de la cGVHD demeure sujette à controverse alors que certaines études ont démontré que la quantité de Tregs était soit diminuée lors de la cGVHD³³¹⁻³³³ ou inchangée^{334,335}. Cependant, de manière plus spécifique, une récente étude a démontré que le taux de Tregs activés demeure inchangé chez les patients atteints de cGVHD alors que celui des Tregs au repos est réduit de manière significative³³⁶. Ceci pourrait être expliqué par le type de cGVHD rencontré. En effet, Uneka et al ont démontré que les patients ayant souffert d'aGVHD avant la cGVHD possédaient un nombre de Tregs inférieur à ceux des patients atteints de cGVHD *de novo*³³⁷. La diminution des Tregs est associée à une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et IL-17³³⁸. Ces résultats concordent avec les observations faites sur modèles murins affirmant que, lors de la cGVHD, les Tregs ne parviennent pas à contrôler les réponses Th1 et Th17³³⁹. Ceci pourrait signifier que le manque de Tregs pourrait être impliqué dans la pathophysiologie de la cGVHD, spécialement au niveau des organes où la maladie est médiée par les réponses Th1 et Th17.

Comme nous avons vu dans cette revue de littérature, l'activité des cellules Th17 a un effet direct sur celle des Tregs. Au niveau de la cGVHD, la signalisation de STAT3 est

primordiale dans le développement de la maladie au niveau de la peau³⁴⁰. L'inhibition de STAT3 est associée à une diminution de la maladie et une augmentation de la population de Treg³⁴⁰. Ceci signifie que les cellules Th17 pourraient jouer un double rôle en induisant directement un dommage tissulaire et en diminuant la quantité de Tregs. Par opposition, une étude de Ratajczak et al a démontré que les patients ayant un ratio Th17/ Treg élevé avaient une cGVHD moins sévère, ce qui suggèrerait un rôle protecteur de la part des Th17³⁴¹. Toutefois, les patients de cette étude étaient atteints de cGVHD au niveau du tractus gastro-intestinal alors qu'au niveau du foie, on retrouve un ratio Th17/Treg élevé³¹³. À ce niveau, la physiopathologie de la maladie demeure inconnue. Puisque dans l'aGVHD, une atteinte à cette organe est liée à une réponse Th1²³⁶, il est possible qu'il en soit autant dans la cGVHD. Il a même été démontré qu'à ce niveau, la réponse Th17 bloque la différenciation des cellules Th1 conférant ainsi aux Th17 un rôle protecteur contre la GVHD³⁴². Toutefois, chez la souris, les Th17 peuvent également sécréter IL-10³⁴³. Bien que cela n'ait pas été encore démontré chez l'homme, cette sécrétion d'IL-10 par les Th17 pourrait expliquer cette observation. De plus, la présence de FOXP3 n'est pas synonyme d'activité T régulatrice chez l'homme³⁴⁴⁻³⁴⁶. Il a d'ailleurs été démontré qu'en présence d'IL-12, les Tregs pouvaient exprimer de l'IFN- γ et perdre le phénotype régulateur³⁴⁷. La plupart des études portant sur l'action des Tregs dans la cGVHD considèrent les Tregs comme étant les cellules FOXP3+. Il se pourrait que ces cellules soient en effet des cellules T en cours d'activation. Ceci aurait pour effet de gonfler le nombre de Tregs observés et biaiser les résultats de l'étude. De plus, la plupart des études portant sur la cGVHD ont lieu chez la souris, où la complexité de la relation Th17/Treg semble différente de celle retrouvée chez l'homme³⁴⁸⁻³⁵⁰. Bref, d'autres études seront nécessaires afin d'approfondir le rôle des Tregs et des Th17 dans la pathophysiologie de la cGVHD.

De plus, l'interaction des Tregs avec les cellules T pourrait également varier selon le type de cGVHD rencontré. En effet, lors des cGVHD progressives et interrompues, il est possible que, lors de l'expansion homéostatique des cellules T, les cellules T ayant une affinité supérieure pour les antigènes de l'hôte démontrent un avantage réplcatif sur les

cellules T non alloréactives. Ceci impliquerait que la plupart des cellules T formant le nouveau système immunitaire soient potentiellement alloréactives. Il se pourrait alors que les Tregs, malgré leur nombre élevé, soient insuffisantes pour inhiber la réaction alloréactive. De plus, lors de la cGVHD *de novo*, où une certaine reconstitution immunitaire est observée, il est possible que la présence de cellules T alloréactives soit due à un dysfonctionnement au niveau du thymus permettant l'entrée dans la circulation de cellules T alloréactives. Une connaissance plus approfondie du rôle des Tregs et de leurs interactions avec les autres populations cellulaires dans l'inhibition la cGVHD est donc nécessaire pour le développement de thérapies efficaces pour la cGVHD.

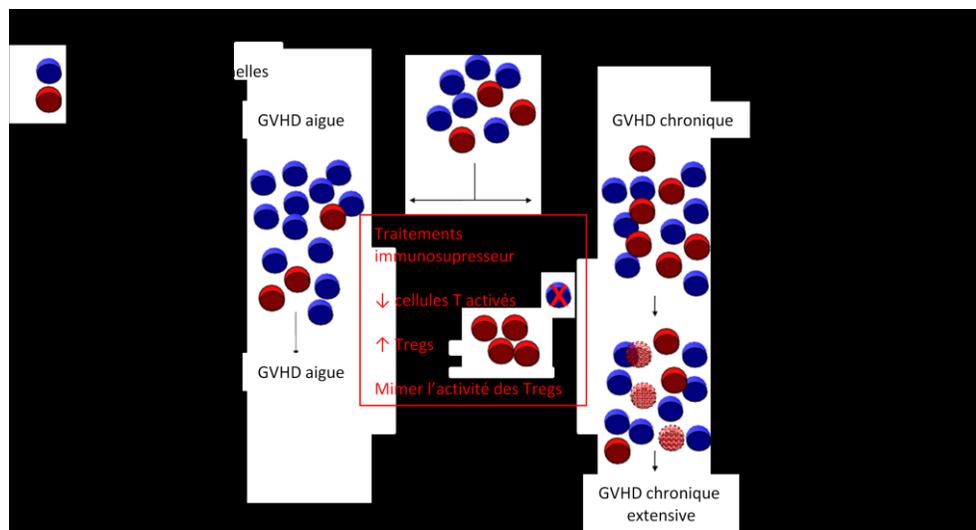


Figure 12 Les Tregs ont une dynamique différente lors de l'aGVHD et de la cGVHD.

8. Les traitements de la cGVHD

Le choix du traitement utilisé contre la GVHD dépend de plusieurs facteurs de risque tels que ceux associés aux rechutes et aux infections virales et bactériennes. En raison du manque de connaissance au sujet de la pathophysiologie de la maladie, il est difficile d'établir une stratégie immunosuppressive adéquate. Puisque la cGVHD est causée par les

cellules T, il est reconnu que la déplétion des cellules T représente une stratégie efficace pour prévenir la GVHD à la fois aigue et chronique³⁵¹. Toutefois, cette perte de cellules T entraîne également une perte de l'immunité anti tumorale et anti infection³⁵². Ceci a amené les chercheurs à tenter de développer des thérapies spécifiques à certaines populations T. Outre la déplétion des cellules T, les agents supresseurs et, plus récemment, la thérapie cellulaire sont fréquemment utilisés seuls ou en combinaison dans la prévention ou le traitement de la cGVHD. Le plus grand défi demeure de dissocier la GVHD de l'effet GVL et de l'immunité contre les infections. En effet, ces composantes de l'immunité peuvent être étudiées séparément chez la souris, mais sont beaucoup plus difficiles à dissocier chez l'homme. Les effets secondaires majeurs de ces thérapies sont l'augmentation de la susceptibilité face aux infections virales, bactériennes ou fongiques et les rechutes de la leucémie. Les agents immunosuppresseurs ont un effet sur une variété de populations cellulaires. Dans cette revue de littérature, nous allons décrire principalement leurs effets sur les cellules T activées ainsi que sur les Tregs.

Parmi les agents immunosuppresseurs, les corticostéroïdes représentent le principal traitement de première ligne pour la plupart des patients souffrant de cGVHD. L'usage de basses doses de corticostéroïdes (1mg/Kg/jour) est associé à une diminution de la maladie sans augmentation du risque d'infections opportunistes, de rechute ni de diminution de la survie des patients³¹⁶. De manière intéressante, la prednisone, le corticostéroïde le plus répandu, possède la capacité d'éliminer les cellules T alloréactives³⁵³ tout en augmentant la population de Tregs³⁵⁴. Il est également associé à une diminution de la sécrétion des cytokines inflammatoires telle que le TNF- α . Toutefois, l'utilisation des corticostéroïdes entraîne des effets secondaires notamment de l'hyperglycémie, des psychoses, des myopathies, des neuropathies et de l'ostéoporose. De plus, plusieurs patients sont réfractaires à ces traitements, ce qui implique que les doses doivent être augmentées avec une hausse concomitante des effets secondaires. Il est alors important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de réduire les doses de corticostéroïdes nécessaires. Pour cette revue, les agents thérapeutiques qui sont utilisés chez les patients nécessitant une

deuxième ligne de traitement ont été divisés en 2 catégories : ceux ayant pour but principal d'éliminer les cellules T activées avec une toxicité envers les Tregs et ceux visant à augmenter principalement la population de Tregs.

8.1. Les agents visant l'élimination des cellules T activées

Puisque la cGVHD est causée par les cellules T activées, plusieurs agents ont pour but l'élimination de cette population. Par contre, ces agents sont souvent également toxiques envers les Tregs, diminuant leur capacité à inhiber la cGVHD.

Inhibiteurs de la calcineurine (CNI)

Cette catégorie d'agents immunosuppresseurs est très utilisée chez les patients souffrant de cGVHD. La cyclosporine A et l'agent de seconde génération tacrolimus font partie de cette catégorie. Ces agents se lient à la protéine cytosolique cyclophiline (pour cyclosporine A) ou FKBP (pour tacrolimus) dans les lymphocytes T. Ce complexe inhibe la protéine calcineurine qui est responsable de l'activation du facteur de transcription NFATc, menant à la sécrétion de l'IL-2³⁵⁵. La cyclosporine A inhibe donc la sécrétion d'IL-2 par les cellules T diminuant ainsi la fonction effectrice des lymphocytes T. Il a été démontré que le traitement des cellules T à la cyclosporine A en présence d'IL-2 entraîne une augmentation de la population Treg tout en réduisant l'activation des cellules T conventionnelles³⁵⁶. Ceci est dû au fait que les Tregs peuvent proliférer de manière indépendante de la stimulation du TCR en présence d'IL-2, donc l'activation de NFATc n'est pas requis pour leur prolifération¹⁰⁴. Toutefois, ce même traitement inhibe la différenciation des Tregs suite à la stimulation du TCR³⁵⁶, ce qui du coup inhibe la différenciation des Tregs dérivés du donneur³⁵⁷. De plus, ils bloquent l'activité des cytochromes c dans la mitochondrie, ce qui a pour effet d'amener les cellules en apoptose. Plusieurs études ont démontré que ces agents ont une cytotoxicité égale envers les cellules T activées qu'envers les Tregs^{358;359}. De plus, lorsque combinés à des agents ayant pour but d'augmenter la population de Tregs, les CNI sont associés à une diminution du nombre de Tregs par rapport aux individus sains³⁵⁹. Les

essais cliniques sur les CNI démontrent une bonne efficacité dans la prévention et le traitement de la cGVHD³⁶⁰. Toutefois, en raison de leur toxicité envers les Tregs, une élimination extensive des cellules T activées est nécessaire afin de contrôler la cGVHD. Ceci augmente les risques de rechute et d'infection.

Les anticorps

Une autre approche permettant d'éliminer les cellules responsables de la cGVHD est de les cibler spécifiquement et de promouvoir leur destruction physique. Dans ce sens, les anticorps monoclonaux s'avèrent très efficaces. La difficulté demeure au niveau de l'identification d'un marqueur spécifique aux cellules T activées que ne possèdent pas les Tregs. Puisque ces deux populations possèdent plusieurs marqueurs en commun, il est difficile d'éliminer spécifiquement une population sans éliminer l'autre. Plusieurs études ont démontrés que l'anti-thymoglobuline, (ATG) pouvait être utilisée avec succès pour prévenir la GVHD sans augmentation du taux de rechute ou d'infection suite à un régime de conditionnement myéloablatif^{361;362}. Par contre, Soiffer et al ont démontré que, lors d'un conditionnement non myéloablatif, cette stratégie s'avère inefficace pour combattre la rechute en raison de l'élimination des lymphocytes T avec une activité anti-leucémique³⁶³. Ce résultat souligne l'importance des cellules T activées dans la prévention des rechutes. Dans ce sens, l'élimination complète des cellules T peut s'avérer néfaste.

L'ATG est également utilisée dans le traitement des patients avec une cGVHD réfractaire au traitement aux corticostéroïdes³⁶⁴. Cependant, l'administration d'ATG en combinaison avec les corticostéroïdes n'entraîne pas une augmentation de la survie comparée aux patients traités aux corticostéroïdes seuls³⁶⁵. Les principaux effets secondaires de l'ATG sont la thrombocytopénie et la lymphopénie, ce qui augmente le risque de développer des infections opportunistes³⁶⁶.

Un autre anticorps monoclonal utilisé dans le traitement de la cGVHD est l'anticorps dirigé contre la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25). CD25 est exprimé par les

cellules T activées et les Tregs, donc cet anticorps entraîne l'élimination de ces deux populations. L'anticorps peut être couplé soit à une toxine, ce qui entraîne une augmentation de l'élimination *in vivo* de ces populations, ou à une bille magnétique permettant leur élimination *ex vivo*. L'utilisation de cet anticorps est associée à des résultats favorables dans la prévention et le traitement de la cGVHD³⁶⁷. Toutefois, les données recueillies pour le traitement de la cGVHD ne sont que préliminaires et d'autres études seront nécessaires afin de confirmer leur effet anti cGVHD.

L'anticorps monoclonal alemtuzumab (anti CD52) est également utilisé dans le traitement de la cGVHD avec pour effet une perte des populations monocytaires, lymphocytaires et de cellules dendritiques³⁶⁸. Il est rapporté que l'alemtuzumab diminue l'intensité de la cGVHD sans toutefois augmenter la survie totale³⁶⁸. Cet effet pourrait également être lié à un taux supérieur de rechute ainsi que d'infections opportunistes chez ces patients.

Les anticorps monoclonaux peuvent également être dirigés contre les cytokines inflammatoires telles que TNF- α et leurs récepteurs. En effet il a été démontré que TNF- α était élevé dans le sérum des patients atteints de cGVHD à partir des 3 mois précédant le déclenchement de la maladie³⁶⁹. Cette stratégie n'a pas été vastement utilisée dans le traitement de la cGVHD. Toutefois, le blocage de cette voie a obtenu un taux de réponse complète de 19-70% chez des patients souffrant de GVHD aigue de grade II-IV^{370,371}. Cette voie pourrait s'avérer prometteuse dans le traitement de la cGVHD surtout chez les patients souffrant de la forme progressive ou interrompue de la maladie. En effet, le profil de leur maladie est potentiellement plus inflammatoire que chez les patients atteints de la forme *de novo*. Toutefois, Veeraputhiran et al ont rapportés une augmentation du taux de rechute chez les patients traités de cette manière³⁷².

Mycophénolate de mofétil (MMF)

Le mycophénolate de mofetil est une pro drogue qui doit être métabolisée dans le foie avant de devenir active. Son principe actif est l'acide mycophénolique. Cet acide inhibe l'activité de l'iosine monophosphatase déshydrogenase, qui contrôle la synthèse de la guanine monophosphatase. Cette dernière est responsable de la synthèse des purines dans la voie *de novo*, voie empruntée lors de la prolifération des lymphocytes T et B. Le mycophénolate de mofetil a donc un effet anti prolifératif sur les lymphocytes. Le MMF ne favorise pas l'expansion des Tregs, mais il est moins cytotoxique envers les Tregs qu'envers les cellules T activées³⁷³. Il existe peu d'études rapportant l'effet du MMF sur les Tregs *in vivo*. Toutefois une étude portant sur la greffe d'ilots pancréatiques a démontré que le MMF pouvait entraîner une hausse des Tregs, mais seulement en présence de vitamine D3, un agent capable d'induire d'IDO³⁷⁴. Il serait donc possible que la hausse de Tregs observée soit due à la présence de vitamine D3 et non au MMF³⁷⁴. Malgré tout, le MMF est utilisé avec succès dans le traitement de la GVHD aigue et chronique³⁷⁵⁻³⁷⁷. Toutefois, un taux plus élevé de rechute et d'infections a été rapporté lors de l'utilisation du MMF en comparaison avec les thérapies de premières lignes seules.

Autres thérapies

La pentostatine est un analogue de nucléoside inhibant l'adénosine déaminase. Cette molécule possède plusieurs effets sur le système immunitaire³⁷⁸. Des études de phases I et II chez l'enfant et l'adulte démontrent un taux de réponse de 53-55% tout en permettant la réduction de la prise de corticostéroïdes³⁷⁹. Les infections sont l'effet secondaire majeur de la pentostatine car ce médicament induit une T déplétion *in vivo* très sévère.

8.2. Les agents visant l'expansion des Tregs

Bien que la corrélation entre une diminution des Tregs et la cGVHD n'ait pas été clairement établie, il est reconnu que les Tregs peuvent exercer un effet inhibiteur sur la réponse T alloréactive. Ainsi, plusieurs thérapies immunosuppressives agissent via une expansion directe ou indirecte de la population Treg.

Injection de Tregs isolés

L'injection de Tregs peut être utilisée soit pour la prophylaxie ou le traitement de la GVHD. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour prévenir et traiter la cGVHD dans des modèles murins³⁸⁰. L'activation des Tregs par les APC de l'hôte permettent d'amplifier ce phénomène. Toutefois, chez l'homme, en raison du manque de marqueurs extracellulaires distinctifs des Tregs, peu de chercheurs ont testé l'efficacité de l'injection de Tregs aux patients souffrant de cGVHD. Toutefois, pour une première fois chez l'homme, Trzonkowski et al a infusé des cellules CD4+CD25+CD127- à un patient souffrant de cGVHD réfractaire et à un patient atteint d'aGVHD de stade IV. Cette étude a démontré que l'injection de ces cellules a permis de guérir le patient atteint de cGVHD et de réduire considérablement les symptômes du patient atteint d'aGVHD³⁸¹. Le même groupe a poursuivi cette étude et a infusé des Tregs à de nouveaux patients. Bien que les patients voient une amélioration de leurs symptômes, une rechute des de la cGVHD est souvent observée³⁸². Toutefois, les patients enrôlés dans ces études souffrent de déficit important du nombre de leurs Tregs et cette thérapie n'est utilisée que par compassion. Ces résultats quoique préliminaires démontrent le potentiel de l'expansion des Tregs chez les patients souffrant de cGVHD, mais également les défis présents afin d'optimiser ce type de traitement dans le contexte de cette maladie.

Pour la prophylaxie de la cGVHD, l'infusion de Tregs humains au moment de la greffe s'est montrée très efficace pour prévenir la GVHD dans un modèle de souris humanisées³⁸³⁻³⁸⁵. Dans les transplantations humaines, l'injection de Tregs à des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse haplo-incompatible permet de prévenir efficacement la GVHD sans gêner la réponse immunitaire contre les infections³⁸⁶. Toutefois, comme pour l'élimination des cellules T activées, une augmentation trop importante des Tregs peut entraîner la perte de l'effet GVL et de l'immunité contre les infections³⁸⁷.

Une autre méthode d'expansion des Tregs in vivo est l'injection dans le patient de cytokines favorisant la prolifération des Tregs. À cette fin, il s'avère possible de profiter de l'expression constitutive de récepteur de l'IL-2 (CD25) par les Tregs. En effet, l'injection de bases doses d'IL-2 a été utilisé avec succès dans la prévention de l'aGVHD³⁸⁸. Une augmentation du nombre de Tregs était alors observée chez ces patients, ce qui se traduisait par une réduction du nombre d'aGVHD sévères. Cette stratégie a également été utilisée pour les patients souffrant de cGVHD réfractaire aux traitements conventionnels^{389;390}. Ceci a permis une augmentation de la population Tregs sans observer de changements sur la population T conventionnelle³⁹⁰. Ceci indique qu'une thérapie à base d'IL-2 pourrait être utilisée afin d'augmenter les Tregs pourrait s'avérer efficace dans le traitement de patients atteints de cGVHD.

Mimer l'activité des Tregs

Une stratégie similaire à l'injection des Tregs est l'injection au patient d'une molécule effectrice des Tregs. La première molécule utilisée à cette fin fut la protéine de fusion CTLA-4-Ig^{391;392}. Les premiers résultats ont démontré que l'injection de CTLA-4-Ig permettait de prévenir la GVHD, ou du moins, de retarder son arrivée³⁹¹. Dans un modèle murin, il a été démontré que CTLA-4-Ig permettait de traiter seulement la cGVHD et non l'aGVHD³⁹¹. En clinique, le CTLA-4-Ig permet de traiter les rejets d'organes solides. À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur la capacité du CTLA-4-Ig à traiter la cGVHD chez l'homme. Toutefois, CTLA-4-Ig possède des effets secondaires importants expliquant ainsi son utilisation limitée en clinique.

Alefacept, une protéine de fusion de LFA-3-Ig, permet de bloquer la costimulation des cellules T mémoires en inhibant leur liaison avec la molécule de costimulation CD2. Cette molécule s'est démontrée efficace dans le traitement de maladies auto-immunes comme le psoriasis³⁹³. Une étude clinique effectuée sur 2 patients atteints de cGVHD

réfractaire a démontré que l'alefacept a entraîné une réponse complète chez un des patients et une réduction de l'érythème cutané chez le second³⁹⁴. Plus récemment, une autre étude clinique a obtenu un taux de réponse de 66% chez des patients atteints de cGVHD³⁹⁵. Les infections demeurent le principal effet secondaire rencontré.

Les agents immunosuppresseurs

Contrairement aux CNI, le sirolimus (ou rapamycine) inhibe la signalisation d'IL2. Sa cible est mTOR, qui est indispensable pour l'activation des cellules T, mais également pour la prolifération cellulaire³⁹⁶. Contrairement aux CNI, le sirolimus n'inhibe pas la sécrétion des cytokines. Par contre, plusieurs études ont démontré que le sirolimus possède la capacité de maintenir la population de Tregs et aussi de favoriser leur expansion³⁹⁷⁻⁴⁰⁰. De plus, le sirolimus n'inhibe pas le signal lors d'une stimulation du TCR. Ceci implique qu'en présence d'une forte stimulation (comme il advient dans les cas de GVHD), le sirolimus favorise le développement des Tregs alors que les CNI inhiberont cette différenciation³⁵⁷. Toutefois, leur capacité à expandre les Tregs n'est que peu mise en valeur parce que le sirolimus est très souvent utilisé en combinaison avec les CNI. En clinique, le sirolimus est utilisé dans la prévention et le traitement de la GVHD aigue et chronique réfractaire avec des taux de réponse respectifs de 24 à 63%⁴⁰¹⁻⁴⁰³. Sa capacité d'expansion des Tregs pourrait permettre au sirolimus d'être utilisé en combinaison avec l'injection de Tregs³⁹⁷.

Les cellules B jouent un rôle primordial dans la pathophysiologie de la cGVHD par leur capacité à activer les cellules T et leur sécrétion d'auto-anticorps. Il a été démontré que le rituximab, un anticorps dirigé contre le CD20 des cellules B, pouvait diminuer l'intensité de la cGVHD avec des taux de réponse variant de 43 à 83%⁴⁰⁴. Il faut préciser qu'outre son effet sur les cellules B, le rituximab parvient à expandre les Tregs⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷. Le mécanisme par

lequel cette expansion a lieu demeure toutefois inconnu. Par ailleurs, on sait que l'activité des cellules B est associée à une augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-4 typiques de la réponse Th2. Or, la signalisation d'IL-4 à travers la protéine STAT6 entraîne la répression de l'expression de FOXP3, ce qui pourrait expliquer la diminution des Tregs dans la cGVHD^{408;409}. La diminution de la sécrétion d'IL-4 causée par l'élimination des cellules B favoriserait ainsi l'expression de FOXP3 causant l'expansion des Tregs. De plus, cette expansion des Tregs n'est pas observée chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, une maladie médiée par la réponse Th1⁴¹⁰.

Certains agents immunosuppresseurs sont présentement en développement dans des modèles animaux, mais n'ont pas encore été utilisés en clinique. Les inhibiteurs de l'histone déacétylase (HDACi) sont de bons candidats pour le traitement de la cGVHD. À faible dose, les HDACi permettent l'inhibition de la sécrétion des cytokines inflammatoires TNF- α , IFN- γ , IL-1 β and IL-12⁴¹¹. Les HDACi peuvent promouvoir l'expansion des Tregs de deux manières distinctes : premièrement, par l'inhibition de HDAC9, un régulateur de FOXP3 lors de la suppression des Tregs⁴¹². Puis, les HDACi peuvent induireIDO dans les cellules dendritiques, ce qui prévient l'activation des cellules T et promeut le développement des Tregs⁴¹³. Il sera intéressant de suivre le développement de cette catégorie d'agents immunosuppresseurs dans le traitement des patients souffrant de cGVHD. Un autre agent prometteur est le RGI-2001, un dérivé liposomal de l' α -galactosylcéramide, qui s'est avéré capable de prévenir la GVHD et d'améliorer la survie des souris suite à une allogreffe grâce à sa capacité à expandre les Tregs⁴¹⁴. Toutefois, le mécanisme par lequel cette expansion a lieu demeure inconnu.

Thérapie cellulaire

Les cellules stromales mésenchymales (MSC)

Les MSC inhibent la réponse immunitaire innée et acquise par des mécanismes paracrines et dépendants du contact cellulaire. En effet, elles peuvent induire l'anergie des cellules T et B, inhiber l'activation des cellules NK, maintenir les cellules dendritiques dans un stade plus immature et tolérogénique ainsi que favoriser le développement des cellules T Th2 et des Tregs⁴¹⁵⁻⁴¹⁸. De plus, les MSC sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance anti-inflammatoires tels que TGF- β , hème oxygénase-1 (HO1), et HLA-G5⁴¹⁹. La présence de cytokines inflammatoires fortement sécrétées lors de la cGVHD, telles que l'IL-1 α/β , le TNF- α et l'IFN- γ , stimule la production de cytokines anti-inflammatoires chez les MSC⁴²⁰⁻⁴²². Ces cytokines stimulent également l'expression d'IDO chez les MSC, ce qui favorise le développement des Tregs. Une étude effectuée par François et al a démontré qu'IDO est un facteur primordial dans l'effet anti-inflammatoire exercé par les MSC⁴²³. Les MSC ont été utilisées en clinique dans le traitement de la GVHD aigue et chronique avec un taux de réponse élevé⁴²⁴. Par contre, les MSC sont incapables de prévenir la GVHD en raison de la nécessité de la présence de cytokines inflammatoires pour leur activation.

9. La photophérese extracorporelle (ECP)

L'ECP est une approche thérapeutique prometteuse utilisée dans le traitement de certains types de cancers et de maladies non oncologiques. Elle est également utilisée sous forme de thérapie cellulaire dans le traitement de la GVHD. Le principe de l'ECP est l'utilisation d'une molécule photosensible, c'est-à-dire que cette molécule devient cytotoxique lorsque mise en présence de lumière d'une longueur d'onde donnée. La thérapie basée sur ce principe se nomme thérapie photodynamique (PDT).

La thérapie par la lumière est étudiée et fait l'objet d'applications thérapeutiques depuis fort longtemps. En effet, la lumière était utilisée en Egypte antique, en Inde et en Chine pour traiter certaines maladies de la peau, certains cancers, le rachitisme et même la psychose⁴²⁵. À l'époque de la France des lumières, la lumière du soleil était utilisée dans le

traitement de divers malaises tels que la tuberculose, le rachitisme, le scorbut, les rhumatismes, la paralysie, l'œdème et la fatigue musculaire. La photothérapie, telle que connue actuellement, est apparue au XIXe siècle, lorsque le médecin Danois Neils Finsen a décrit un traitement réussi de la variole en utilisant la lumière rouge pour empêcher la suppuration des pustules⁴²⁶. Ce médecin a continué en utilisant le spectre ultraviolet pour traiter la tuberculose cutanée. Le concept de mort cellulaire induite par la PDT est apparu il y a 100 ans alors que Raab a découvert que la combinaison d'acridine rouge et de lumière avait un effet mortel sur l'infusoria, une espèce de paramécie. La première étude faisant allusion à l'administration parentérale d'un agent photosensibilisateur date du début du siècle dernier où Jesionek a utilisé une combinaison d'éosine et de lumière blanche pour traiter des tumeurs de la peau⁴²⁵.

Principe de la photodéplétion

La PDT repose sur un principe : celui de l'activation par la lumière d'une longueur d'onde précise d'un médicament photosensible qui est inerte en absence de lumière. Les agents photosensibilisateurs peuvent induire un dommage cellulaire de plusieurs manières. En effet, lorsqu'il absorbe la lumière d'une longueur d'onde donnée, l'agent photosensible passe d'un état stable à un état excité (singlet). Pour retourner à l'état stable, l'agent peut soit émettre de la fluorescence ou passer par un état très instable dit triplet (demi-vie moyenne: 10^{-8} secondes). Cet état triplet peut alors interagir avec l'oxygène ambiant et former un état excité d'oxygène singlet. À cet état, l'oxygène devient très réactif et peut interagir avec plusieurs substrats biologiques, induire des dommages tissulaires et la mort cellulaire. La plupart des agents photosensibles utilisés dans le traitement des cancers et de la GVHD agissent de cette manière.

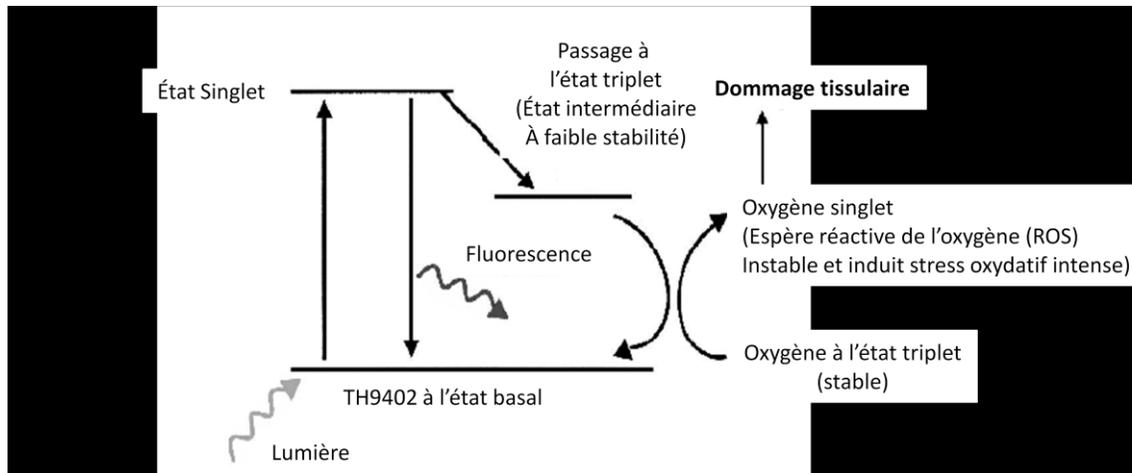


Figure 13 Mécanisme d'action des agents photosensibles

Le type de dommages causés dépend de la localisation intracellulaire de l'agent. Les principaux agents photosensibles utilisés à ce jour dans le traitement des cancers et la GVHD sont la photofrine et le 8-méthoxypsoralène (8-MOP). La photofrine se localise dans la membrane plasmique de la cellule. Les singlets d'oxygène ainsi créés réagiront avec les lipoprotéines de la membrane et entraîneront une perte de son intégrité. Ceci résulte en la mort par nécrose des cellules exposées à la photofrine. Cette mort par nécrose induit en signal de danger favorisant la réponse immunitaire inflammatoire. Cet agent est donc utile dans le traitement des cancers où l'inflammation permet une réponse anti-tumorale plus efficace. À l'opposé, le 8-MOP se localise principalement au niveau du noyau où il s'intercale dans l'ADN. Après son activation par les rayons UV, le 8-MOP crée des liens covalents entre les bases adénines et thymines (Voir Figure 14). Ceci a pour effet d'inhiber la synthèse de l'ADN et d'induire la mort par apoptose des cellules exposées. De plus, le 8-MOP permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques⁴²⁷. Dans le contexte de la GVHD, l'injection de cellules apoptotiques au patient permet la phagocytose de celles-ci par les monocytes et les cellules dendritiques immatures du patient^{428;429}. Cette réaction induit une tolérance immune et permet de contrôler la GVHD.

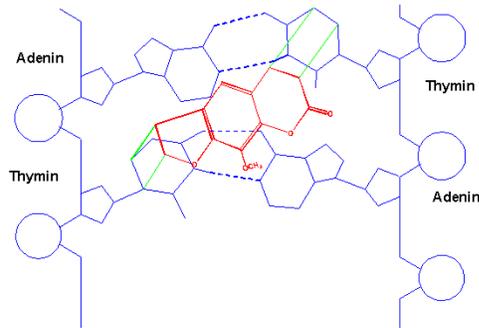


Figure 14 Mécanisme d'inhibition de la synthèse d'ADN du 8-MOP. Le 8-MOP crée des liens covalents entre les bases adénines et thymines de l'ADN. (Tiré de ⁴³⁰)

Le 8-MOP est de plus en plus utilisé dans le traitement de la cGVHD. Plusieurs études sur des modèles murins et cliniques ont démontré que l'injection de cellules traitées à l'ECP au 8-MOP permet l'expansion des Tregs⁴³¹. De plus, Di Biaso et al ont démontré une corrélation entre cette augmentation de Tregs et la réponse clinique⁴³². Il est toutefois accepté que cette augmentation des Tregs passe par un effet sur les cellules dendritiques. Ces dernières favorisant l'induction des Tregs. Cependant, les patients atteints de GVHD possèdent un taux diminué d'APC comparé aux donneurs sains et aux patients greffés ne souffrant pas de GVHD (Bastien et al, chapitre4 et ⁴³³). Une approche thérapeutique impliquant directement les cellules T pourrait s'avérer encore plus efficace afin d'induire la tolérance.

10. TH9402

Le dibromo rhodamine, 123-methyl-ester (TH9402) est un autre agent photosensible (Voir Figure 15). Cette molécule est un dérivée de la rhodamine. La présence des 2 molécules de brome permet de stabiliser la forme triplet de la molécule, ce qui permet à

cette molécule d'interagir avec l'oxygène lui conférant son effet cytotoxique. À l'opposé du 8-MOP, le TH9402 se localise dans la mitochondrie (Bastien, données non publiées) et est activé par la lumière visible. Ceci rend son utilisation plus sécuritaire, puisque, contrairement aux rayons UV, la lumière visible ne possède pas de potentiel mutagénique.

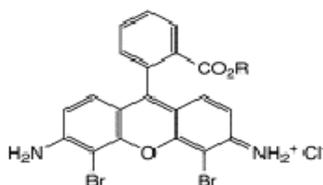


Figure 15 Molécule de dibromo rhodamine, 123-methyl-ester (TH9402)

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont permis de découvrir que le TH9402 est toxique spécifiquement envers les cellules T activées par rapport aux cellules T au repos. Cette différence est, dans un premier temps, due à l'inactivation de la pompe PgP-170 lors de l'activation des cellules T⁴³⁴. Cette pompe est responsable de l'extrusion du TH9402 hors de la cellule. Son inactivation bloque ainsi l'extrusion du TH9402 de celle-ci. L'incorporation préférentielle du TH9402 dans les cellules activées les rend plus sensibles au traitement. Une autre raison non mutuellement exclusive pouvant expliquer cette sensibilité augmentée des cellules T activées est que leur métabolisme se retrouve augmenté à cet état. Ceci peut se traduire par une augmentation du stress oxydatif dans la cellule. La formation de singlets d'oxygène par le TH9402 entraîne une augmentation fulgurante du stress oxydatif dans la cellule pouvant dépasser les capacités intrinsèques de celle-ci à faire face au stress oxydatif (Aubé et al, en préparation). Cela pourrait alors causer la mort de la cellule.

Cette effet sélectif est présentement utilisé avec succès pour la prévention de la GVHD dans le contexte de greffes haplo-incompatibles. Le greffon peut ainsi être « nettoyé » des cellules alloréactives avant d'être infusé à l'hôte^{435;436}. Cette méthode

permet d'infuser aux patients des doses élevées de cellules T leur permettant d'avoir une meilleure réponse aux infections et d'éviter les rechutes. Toutefois, Guimond et al ont observé une petite population de cellules CD4+ exprimant CD25 résistantes au traitement au TH9402 (Voir Figure 16) ⁴³⁴. Il fut alors émis comme hypothèse que ces cellules résistantes pouvaient être des Tregs. Plus tard, Mielke et al ont démontré que ces cellules exprimaient FOXP3⁴³⁷. Toutefois aucune étude fonctionnelle n'avait permis de démontrer que ces cellules étaient bien des Tregs.

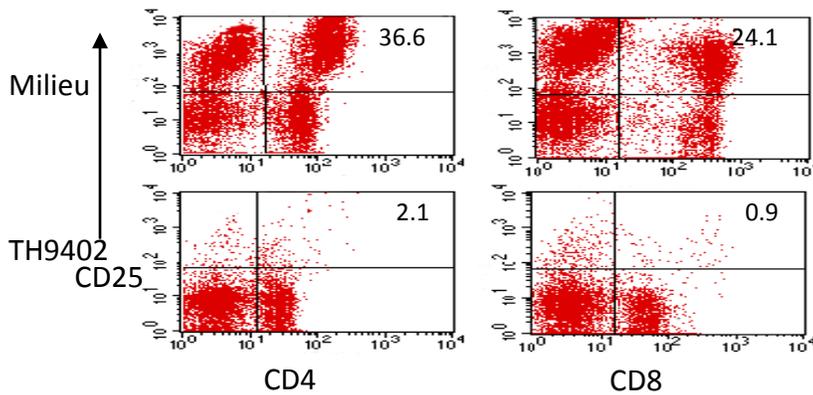


Figure 16 Le traitement au TH9402 préserve une petite population de cellules CD4+ exprimant CD25 et qui pourraient représenter des cellules Tregs (Tiré de⁴³⁴)

11. Hypothèse et objectifs

Hypothèse

Suite aux résultats émis avant mon arrivée au laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que la petite population CD4+CD25+ résistante à la photodéplétion était bien les cellules T régulatrices. Ainsi, la photodéplétion au TH9402 permettrait de préserver des Tregs fonctionnels. Cet effet sélectif d'élimination des cellules T activées et de préservation des Tregs pourrait faire du TH9402 un agent thérapeutique redoutable dans le traitement de la cGVHD. En effet, puisqu'au lieu d'agir à travers les cellules dendritiques, réduites dans la GVHD, le TH9402 pourrait agir directement sur les cellules T responsables de la GVHD et enrichir directement la population de Tregs.

Objectifs

Dans ce présent projet, nous chercherons à découvrir si la population Tregs est préservée en nombre ainsi qu'en fonction. Puis, nous évaluerons par quel mécanisme les cellules traitées à la photodéplétion peuvent inhiber l'activité des cellules T alloréactives. Si ce mécanisme implique directement les Tregs, nous chercherons également à savoir par quel mécanisme les Tregs peuvent inhiber la réponse alloréactive chez le patient souffrant de cGVHD. Nous chercherons également à déterminer l'interaction de ces Tregs avec d'autres populations cellulaires (particulièrement les APC) et évaluer si les Tregs sont capables de d'inhiber la réponse alloréactive seuls ou s'ils requièrent la présence des APC. Nous chercherons finalement à vérifier la présence de ces mécanismes *in vivo* chez le patient souffrant de cGVHD.

Chapitre 2 : Article 1

Article publié dans le journal Blood,
Décembre 2010

**Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs
versus CD4+ effector T cells from patients with
chronic graft-versus-host disease**

Jean-Philippe Bastien,^{1,2} Gorazd Krosl,¹ Cynthia Therien,¹
Marissa Rashkovan,¹ Christian Scotto,¹ Sandra Cohen,^{1,2} David S. Allan,³ Donna
Hogge,⁴ R. Maarten Egeler,⁵ Claude Perreault,^{1,2} and Denis Claude Roy^{1,2}

¹Division of Hematology-Oncology, Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center,
Montreal, Canada

²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada

³Blood and Marrow Transplant Program, The Ottawa Hospital, Ottawa, Canada

⁴Leukemia/BMT Program of British Columbia, Vancouver, Canada

⁵ Kiadis Pharma, Amsterdam, The Netherlands

Key Words: Regulatory T cells, Immune regulation, Chronic graft-versus-host disease (GVHD), Extracorporeal Photopheresis, Photodepletion.

Supported by Kiadis Pharma and the Fonds de la recherche en sante du Quebec

Corresponding Author:

Denis Claude Roy, MD

Div. Hematology-Oncology

Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center
5415 l'Assomption blvd.

Montreal, Quebec, H1T 2M4

Canada

Telephone : 514-252-3400 ext 3331

Fax : 514-252-3430

Even the most potent immunosuppressive drugs often fail to control graft-versus-host disease (GVHD), the most frequent and deleterious post-transplant complication. We previously reported that photodepletion using dibromorhodamine (TH9402) eliminates T cells from healthy donors activated against major histocompatibility complex (MHC)-incompatible cells and spares resting T cells. In the present study, we identified photodepletion conditions selectively eradicating endogenous proliferating T cells from chronic GVHD patients, with concomitant sparing and expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells. The regulatory T cell (Treg) nature and function of these photodepletion-resistant cells was demonstrated in co-culture and depletion/repletion experiments. The mechanism by which Tregs escape photodepletion involves active P-glycoprotein-mediated drug efflux. This Treg inhibitory activity is attributable to interleukin-10 secretion, requires cell-cell contact and implies binding with CTLA-4. Preventing CTLA-4 ligation abrogated the in vitro generation of Tregs, thus identifying CTLA-4-mediated cell-cell contact as a crucial priming event for Treg function. Moreover, the frequency of circulating Tregs increased in chronic GVHD patients treated with TH9402 photodepleted cells. In conclusion, these results identify a novel approach to both preserve and expand Tregs while selectively eliminating CD4⁺ effector T cells. They also uncover effector pathways that could be used advantageously for the treatment of patients with refractory GVHD.

Introduction

Patients with chronic graft-versus-host disease (GVHD) suffer from considerable organ damage leading to significant morbidity, frequent hospitalizations, and high mortality rates.⁴³⁸⁻⁴⁴⁰ While potent immunosuppressive agents have been developed, a large number of patients either fail to respond or develop secondary treatment refractoriness.⁴⁴¹⁻⁴⁴³ Moreover, their prevalent side effects emphasize the need for innovative treatment strategies. Cellular therapy in the form of extracorporeal photopheresis (ECP) offers an interesting therapeutic option in terms of both efficacy and safety. It mostly utilizes 8-methoxypsoralen as photosensitizer and ultraviolet illumination to provoke immune modulation.⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶

The new generation photosensitizer 4,5-dibromorhodamine-123 (TH9402) is an attractive candidate for ECP because it demonstrates particularly potent cytotoxicity, uses visible light, and its unique ability to preferentially eliminate activated over resting T cells may translate into an appealing approach to eliminate pathogenic host-reactive T cells in patients with chronic GVHD.⁴⁴⁷ Indeed, T cells activated upon exposure to mitogens or major histocompatibility complex (MHC)-disparate targets in a mixed lymphocyte reaction (MLR) are eliminated following TH9402 photodepletion.^{448,449} Such photodepletion of alloreactive cells also prevents the development of graft-versus-host disease (GVHD) after MHC-mismatched transplantation and preserves graft-versus-leukemia activity in a murine model.⁴⁵⁰ Moreover, a Phase I clinical trial of allogeneic MHC-mismatched transplantation followed by infusion of donor lymphocytes depleted of their alloreactive component using TH9402 photodepletion also provides evidence that such photodepletion can prevent the development of infections without causing GVHD.⁴⁵¹ Interestingly, some CD4⁺CD25⁺ cells are resistant to TH9402 photodepletion,⁴⁴⁸ and the fact that this cell subset is FOXP3⁺ further suggests that these cells might be regulatory T cells (Tregs), and could be used for the treatment of GVHD.^{446,452-456} However, these findings were obtained following photodepletion of healthy donor cells activated in vitro rather than cells from GVHD

patients that demonstrate immune dysregulation. In addition, whether Tregs surviving photodepletion have preserved function, and how they exert their activity, has not been investigated.

The purpose of the present study was to determine whether TH9402 photodepletion could be used to generate Tregs while selectively eliminating endogenous host-reactive T cells circulating in the peripheral blood of patients with chronic GVHD. We first identified novel photodepletion conditions inhibiting T cell proliferation through concomitant depletion of host-reactive T cells and preservation of functional Tregs. In addition, the ability of photodepleted GVHD cells to abrogate the proliferation of untreated patient GVHD cells was mediated by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells, as demonstrated in depletion/repletion studies. Moreover, we found that the inhibitory function of photodepletion-resistant Tregs was attributable to IL-10 secretion, and that their inhibitory activity required initial exposure of these photodepleted cells to untreated cells from chronic GVHD patients. Finally, cell-cell contact through CTLA-4 was crucial to the suppressive effect of Tregs as well as to their production, which was observed both in vitro and in vivo. Thus, with its dual effects on Tregs and host-reactive cells, TH9402 photodepletion represents a particularly appealing alternative for the treatment of patients with steroid-refractory chronic GVHD.

Patients, materials, and methods

Patients and healthy donors

Peripheral blood samples were obtained from healthy donors (n=5) and from chronic GVHD patients (n=10) failing to respond to at least two different immunosuppressive agents including corticosteroids. These patients all underwent allogeneic stem cell transplantation at Hopital Maisonneuve-Rosemont (HMR) and suffered from extensive chronic GVHD according to the NIH Consensus Development Project criteria.⁴⁵⁷ Additional samples from 5 patients transplanted at HMR (n=3), Vancouver General Hospital (n=1), and Ottawa Hospital (n=1), and satisfying these criteria were evaluated at weeks 0, 2, 4, and 8 of weekly ECP treatments in a Phase I/II clinical trial evaluating the safety, biological, and clinical efficacy of ECP using TH9402-treated apheresis products in subjects with extensive steroid-refractory chronic GVHD. Laboratory studies were approved by the HMR Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients and healthy donors. The clinical photodepletion protocol was approved by each institutional Ethics Committee.

Photodepletion

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from chronic GVHD patients were isolated using density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Montreal, QC, Can) and resuspended at a concentration of 1×10^6 cells/mL in X-Vivo 15 medium without phenol red (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented with 2.5% heat inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Hyclone, Logan, UT, USA). Cells were incubated for 45 minutes in the presence of $1.32 \mu\text{M}$ 4,5-dibromorhodamine (TH9402; Kiadis Pharma, Amsterdam, Netherlands) at 37°C , 5% CO_2 , and exposed in T75 flasks (VWR, Ville Mont-Royal, QC, Can) to 5 J/cm^2 visible light (514 nm) delivered by a scanning device (Kiadis Pharma). To determine the role of P-glycoprotein in Treg photodepletion, cells were exposed to $50 \mu\text{M}$ verapamil (Sigma-

Aldrich, Oakville, ON, Can.) during the incubation with TH9402 and light exposure. Then, viability, phenotypic analysis, and Treg function were evaluated.

Patients treated under the clinical Phase I/II study of ECP underwent 7 weekly leukapheresis followed by photodepletion ex vivo using the above TH9402 treatment protocol, except that iFBS was replaced by autologous serum, and 1×10^8 photodepleted cells were reinfused to the patient on the same day.

Regulatory T cell function

TH9402 photodepletion or untreated cells corresponded to effector (E) cells, while untreated cells from the same GVHD patient were used as targets (T). To measure Treg function, effector cells were incubated with target cells at E:T ratios ranging from 1:16 to 1:1 in round bottom 96-well or transwell plates (both Corning, Nepean, ON, Can.) at 37°C under 5% CO₂ for 5 days. Culture medium consisted of RPMI-1640 supplemented with 10% iFBS, 1mM sodium pyruvate, modified eagle medium non essential amino acids, 2 µM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (all Gibco, Burlington, ON, Canada), 5×10^{-5} M β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and 50 IU/mL IL-2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Cell proliferation was measured after 5 day-cultures by pulsing cells with 1 µCi/well (0.037mBq) ³H-thymidine (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) for the last 18 hours. Cells were then harvested using a Packard Filtermate Cell Harvester-Unifilter 96 unit (Packard, Groton, CT, USA) onto Unifilter plates (Millipore, Nepean, ON, Can), and ³H-thymidine incorporation measured using a Topcount NXT Microplate Scintillation and Luminescence counter (Packard). Similarly, healthy donor control PBMC were stimulated by exposure for 96 hours at 37°C under 5% CO₂ to MHC-mismatched cells irradiated (Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion, Ottawa, On, Can) at a dose of 6000 cGy as previously described.⁴⁴⁸ Treg activity was measured after cells were harvested and exposed or not to photodepletion.

EdU proliferation assay

Cell proliferation was also measured after the addition of 10 μM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen, Burlington, ON, Can.) to the culture. EdU incorporation was evaluated using Pacific blue conjugated azide (Invitrogen) and analyzed by flow cytometry (FACS LRS II, BD Bioscience). Lectin-mediated T cell activation was analyzed after 72 hour incubation with 2 μg phytohemagglutinin A (PHA, Sigma-Aldrich).

Flow cytometry analysis

Flow cytometry assessment was performed using: FITC-conjugated anti-CD4 (clone RPA-T4), anti-CD8 (clone RPA-T8), anti-CD25 (clone M-A251), PE-conjugated anti-CD25 (clone M-A251), APC conjugated anti-CD8 (clone RPA-T8) (all from Becton Dickinson (BD) Bioscience, Mississauga, ON Canada), and PerCP-conjugated anti-CD4 (clone MEM-241) (Abcam, Cambridge, MA, USA) monoclonal antibodies. For intracellular staining, PE-conjugated anti-FOXP3 (clone PCH101, eBioscience, San Diego, CA, USA) was used according to manufacturer's instructions. Intracellular IL-10 expression was measured using an APC-conjugated anti-human IL-10 antibody (clone JES3-19F1, Biolegend, San Diego, CA, USA). Prior to staining, cytokine production was stimulated by 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMA / 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin for 4 hours, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ brefeldin A (all Sigma-Aldrich) added for the last 2 hours. All stainings were made in the presence of unconjugated FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) at saturation in order to prevent non-specific staining. 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (BD Bioscience) was also added prior to analysis of cells without intracellular staining in order to exclude dead cells. $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cells were isolated and stained with a mitochondrial dye (Mitotracker Deep Red, Invitrogen) prior to co-culture to enable their discrimination from the $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells added. FOXP3 analysis of cells from patients in the clinical study was performed in triplicate. At least 5×10^4 events were acquired using FACS LSRII (BD Bioscience), and analyzed using Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Regulatory T cell depletion and isolation

Tregs were depleted or reintroduced prior to photodepletion using the CD4⁺CD25⁺ human regulatory T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) which consisted of a negative selection for CD4⁺ cells, followed by a positive selection for CD25⁺ cells using magnetic microbeads conjugated antibodies and the MACS LS columns (Miltenyi Biotec). After isolation of CD4⁺CD25⁺ cells, Tregs were added back to Treg-depleted (CD4⁺CD25⁻) PBMC. Repletion conditions implied the reintroduction of Tregs (CD4⁺CD25⁺) before photodepletion and in proportions identical to those of the initial cell product.

Cytokine titration

Photodepletion treated and untreated cells from chronic GVHD patients were co-cultured with untreated cells from the same patient at different E:T cell ratios for 96 hours. Cells were then harvested, and supernatants collected and stored at -80°C until analysis. Cytokine titration was performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IFN- γ , TNF- α , IL-10 (Assay Design, Ann Arbor, MI, USA), and TGF- β (Biosource, Montreal, QC, Can.) following manufacturers' protocols.

Functional inhibition of Treg mediators

Biological activity of Treg mediators was inhibited using anti-IL-10, anti-TGF- β , anti-GITR (R&D system), anti-CTLA-4 (Exalpa biological, Shirley, MA, USA) or isotype matched irrelevant mouse monoclonal antibodies (Sigma-Aldrich). To ensure inhibition by the mAbs, we used concentrations 10-times greater than the neutralizing dose 50 (ND50) provided by the manufacturer. Cells were then co-cultured for 5 days and proliferation determined by measuring ³H-thymidine uptake.

Statistical analysis

Photodepletion and untreated cell numbers were compared using the Mann-Whitney test. GVHD cell proliferations in the presence of photodepletion or untreated cells were

compared using ANOVA tests. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Photodynamic inhibition of proliferating cells from GVHD patients

To harness the therapeutic potential of TH9402 photodepletion for patients with immune dysregulation, we have evaluated several photodepletion processing parameters (concentration, incubation time, dye efflux period, and light energy). A first evaluation using healthy control cells allowed us to identify treatment conditions eliminating greater than 75 % of MHC-mismatched MLR activated cells (data not shown). The capacity of this novel photodepletion approach, incorporating a low (1.32 μ M) TH9402 concentration, to eliminate endogenously proliferating T cells was then evaluated in patients with chronic GVHD. Because chronic GVHD has been shown to be predominantly due to non-cytotoxic host-reactive helper T lymphocytes directed against peptides on MHC class II molecules, our studies focused on the elimination of this cell population.⁴⁵⁸⁻⁴⁶⁰

All GVHD patients tested (n=10) had severe extensive chronic disease and were refractory to at least 2 immunosuppressive agents. Photodepletion under these novel treatment conditions induced a dramatic decrease in GVHD patient cell proliferation, as measured in a conventional ³H-thymidine incorporation assay (10 906 \pm 5 177 and 4 226 \pm 3056, mean \pm SD, no photodepletion and photodepletion, respectively; n=10; p<0.001; Figure 1A). The decreased ³H-thymidine incorporation in IL-2 supplemented culture medium could result from decreased proliferation or increased apoptosis of PBMC from GVHD patients.

These results prompted us to evaluate the impact of photodepletion on CD4⁺CD25⁺ cells, which should correspond to proliferating cells after culture for 3 days in the presence of IL-2. Interestingly, a substantial number of these cells escaped photodepletion (Figure 1BD).

However, two types of CD4 T cells express CD25 and therefore proliferate extensively in the presence of IL-2: “activated” T cells including host-reactive CD4 T cells with a pro-GVHD activity (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻) and Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) cells. We therefore sought to evaluate the effect of TH9402 photodepletion on these two cell types. We found that TH9402 photodepletion did not affect the absolute number of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells, but significantly decreased the number of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ (Figure 1B-D). As a result, photodepletion led to a major decrease in the proportion of effector-memory phenotype CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻ cells ($p < 0.001$).

Photodepletion preserves functional Tregs from healthy individuals

To gain further insight into the susceptibility of Tregs to photodepletion and to ensure that Tregs escaping photodepletion were functional, CD4⁺CD25⁺ cells (greater than 95% purity) were immunomagnetically isolated from healthy individuals. These CD4⁺CD25⁺ cells underwent photodepletion or not, incubation with CD4⁺CD25⁻ cells, and subsequent exposure to allogeneic stimulators for 5 days. CD4⁺CD25⁻ cells demonstrated a solid proliferative response to allogeneic MHC-mismatched stimulators (Figure 2A). The addition of CD4⁺CD25⁺ Tregs, whether exposed or not to photodepletion, thwarted substantially the CD4 response ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively; $n=3$). Photodepletion had a minimal effect on the function of Tregs ($p < 0.01$), but preserved most Treg activity.

To confirm the immunosuppressive effect of photodepletion cells and to determine whether their inhibitory effect is sufficiently potent to abrogate a very strong proliferative signal, lectin (PHA)-activated PBMC from healthy individuals underwent TH9402 photodepletion and subsequent coculture with untreated autologous PHA-primed cells. Cellular proliferation, as evaluated by EdU labeling after 3 days of coculture (Figure 2B), showed that the addition of photodepleted PBMC decreased cell divisions in response to PHA from CD4⁺ and CD8⁺ cells. These results demonstrate that photodepletion cells inhibitory activity is present against both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes, and that this cell-mediated

inhibition of proliferation is sufficiently robust to reduce cell proliferation in response to a very potent proliferative signal.

Treg enrichment and expansion after photodepletion of GVHD patient cells

Because photodepletion spared Tregs from healthy individuals, and cells corresponding immunophenotypically to Tregs from GVHD patients, we determined the impact of photodepletion on Treg functionality of GVHD patient cells. When PBMC from GVHD patients having undergone TH9402 photodepletion were incubated for 5 days with the same patient's untreated cells, they induced a drastic inhibition of untreated cell proliferation (Figure 3A; E:T 0.125:1 to 1:1 vs untreated targets alone (0:1) cells, $p < 0.001$; $n = 6$). By contrast, addition of graded numbers of untreated GVHD effector cells to GVHD target cells led to enhanced global proliferation that correlated with the increase in untreated cell numbers. This ultimately resulted in doubling of the initial target cell proliferation level upon addition of an identical number of untreated effectors to the targets (1:1). In addition, increasing the effector to target ratios resulted in an enhancement of the differential proliferative activity of target cells exposed to treated versus untreated effectors ($p < 0.001$). Thus, photodepletion of GVHD patient cells inhibited spontaneous (E:T ratio of 1:0) proliferation and suppressed autologous MLR reactivity. Interestingly, effector cell incubation with TH9402 without light exposure, or with light exposure but without TH9402 had no effect on proliferation, while combining TH9402 and light caused major inhibition of target cell proliferation (Supplementary Figure 1A), confirming the specificity of the photoactive treatment.

To further investigate the photodepletion-mediated inhibition of proliferation in non-photodepleted cells, patient cells undergoing photodepletion were added to untreated cells at a 1:1 ratio, and their proliferation measured using EdU flow cytometry labeling (Figure 3B). The incubation of photodepleted GVHD cells with untreated cells induced a net decrease in their DNA replication (EdU incorporation) levels in comparison with cells incubated with non-photodepleted GVHD cells. However, the former showed higher

proliferation than cells from healthy donors, demonstrating that GVHD cells having undergone photodepletion still had the intrinsic ability to replicate. In order to determine whether the inhibitory effect of photodepletion cells could be ascribed to CD4⁺CD25⁺ Tregs, CD4⁺CD25⁺ cells were immunomagnetically removed from photodepletion cells before their addition to target cells. Depletion of CD4⁺CD25⁺ cell resulted in complete abrogation of photodepletion-mediated inhibition of target cell proliferation under conditions where the same number of non-CD4⁺CD25⁺ depleted photodepletion cells showed clear anti-proliferative activity (p<0.001) (Figure 3C). Thus these results provide solid evidence that the inhibitory effect of photodepletion cells is mediated by CD4⁺CD25⁺ Tregs.

Treg depletion / repletion regulates the photodepletion inhibitory effect

To further assess the role of Tregs in photodepletion-mediated inhibition of target cell proliferation, MLR activated effector cells underwent photodepletion in the context of Treg depletion and repletion (Figure 3DE). Photodepletion of MLR activated cells decreased DNA replication upon their addition to untreated MLR targets at a 1:1 ratio (Figure 3D). In contrast, Treg depletion of effector cells prior to photodepletion increased target cell proliferation to the level of cells exposed to non- photodepletion effector cells. Treg repletion restored the suppressive potential of photodepletion cells. Indeed, the proportion of IL-10 secreting Tregs more than doubled under photodepletion conditions, whether untreated or following Treg repletion (Figure 3E). Interestingly, in non-photodepletion conditions, neither Treg depletion nor repletion alone affected cell proliferation, suggesting that Treg numbers have to surpass a defined threshold to exert a significant effect. These depletion / repletion experiments thus confirmed the major role of Tregs in photodepletion-mediated inhibition of proliferation.

The inhibitory effect is mediated by post-photodepletion Tregs

We then sought to evaluate more precisely the impact of photodepletion on Treg numbers among PBMC from GVHD patients. Interestingly, the proportion of FOXP3⁺ cells among

CD4⁺ cells more than doubled when GVHD cells were co-cultured for 3 and 6 days with photodepletion exposed cells versus untreated cells (Figure 4A), corresponding to a similar doubling of the absolute number of CD4⁺FOXP3⁺ cells (Figure 4B) (p<0.01). To investigate if this increase in the Treg population could be due to their proliferation, CD4⁺FOXP3⁺ cells were stained with Ki67. Interestingly, Tregs demonstrated the same level of Ki67 labeling whether they were co-cultured with cells exposed or not to photodepletion (Figure 4C). EdU labeling confirmed that exposure to photodepletion cells did not promote DNA replication over that of untreated GVHD cells. This lack of proliferative difference in the overwhelming majority of CD4⁺FOXP3⁺ Tregs strongly suggests that the post-photodepletion increase in the number of Tregs is not due to enhanced proliferation. To determine if the photo-treatment itself was responsible for conversion into a Treg phenotype, CD4⁺CD25⁻ cells were isolated and treated with photodepletion. Photodepletion did not induce FOXP3 expression in CD4⁺CD25⁻ cells (Figure 4E). However, the addition of photodepleted CD4⁺CD25⁺ cells to CD4⁺CD25⁻ cells that had undergone staining with Mitotracker dye prior to the co-culture led to an increased proportion of Mitotracker positive cells expressing FOXP3. This was observed both in the presence of IL-2 alone or with additional allo-stimulation (p<0.05) (Figure 4F). Thus these results demonstrate that the increase in Treg numbers reflects a conversion from CD4⁺FOXP3⁻ into CD4⁺FOXP3⁺ cells and that this conversion is induced by photodepleted CD4⁺CD25⁺ Tregs.⁴⁶¹

Treg survival relies on a functional P-glycoprotein transporter

We have previously shown that P-glycoprotein is not only responsible for the cellular efflux of native rhodamine but also of its TH9402 derivative.⁴⁴⁸ In order to determine whether Tregs use P-glycoprotein to escape photodynamic elimination, patient cells were exposed to TH9402 photodepletion in the presence of the potent P-glycoprotein inhibitor verapamil. Upon verapamil exposure, CD4⁺CD25⁺ cells accumulated greater amounts of TH9402 than cells incubated with TH9402 but without verapamil, as measured by flow cytometry (data not shown). Moreover, the addition of verapamil in the context of

photodepletion led to a dramatic impairment in T cell viability in CD4 T cells expressing high, intermediate or low levels of CD25 (Figure 4E) (verapamil+photodepletion vs photodepletion only, n=3, p<0.001, compilation not shown). Most importantly, verapamil-induced TH9402 cell loading prior to illumination completely abrogated the ability of photodepletion cells to inhibit GVHD target cell proliferation (Figure 4F). Therefore, these results demonstrate that Tregs survived the photodepletion procedure because they harbor a functional P-glycoprotein transporter. In addition, the fact that verapamil caused massive death of photodepletion-treated cells, but did not impair target cell proliferation implies that the photodepletion inhibitory effect is not caused by toxic mediators released from dying cells after photodepletion, but is rather actively mediated by cells surviving photodepletion.

Increased inhibitory cytokine secretion following exposure to photodepletion cells

In order to determine which mechanism is utilized by Tregs from GVHD patients to exert their inhibitory activity, the involvement of the crucial Treg inhibitory cytokines IL-10 and TGF- β was assessed. IL-10 levels increased significantly when photodepletion cells were added to untreated GVHD cells (p<0.05) (Figure 5A). IL-10 involvement was confirmed in neutralization experiments where incorporation of anti-IL-10 monoclonal antibodies resulted in a clear loss of the inhibitory effect (Figure 5B and Supplementary Figure 2A). In contrast, soluble TGF- β levels failed to increase upon addition of photodepletion cells (Figure 5C). Also, monoclonal antibody neutralization of TGF- β did not have any effect on proliferation inhibition (Figure 5D), confirming the lack of TGF- β involvement, whether in soluble or membrane form, in photodepletion -induced Treg activity. We also observed no changes in the levels of IFN- γ and TNF- α upon exposure to untreated or photodepletion cells (Supplementary Figure 2BC). We therefore conclude that photodepletion -preserved Tregs exert their inhibitory function through enhanced secretion of IL-10 but not TGF- β , IFN- γ or TNF- α .

Crucial role of cell-cell contact and CTLA-4 in Treg-mediated inhibitory effect

Murine CD4⁺CD25⁺ Tregs require prior activation through their TCR to acquire full inhibitory potential, a step implying cell-cell contact and independent of cytokines.⁴⁶² This raises questions about the initial steps leading to the activation and inhibitory activity of Tregs in patients with GVHD. To investigate the connection between IL-10 secretion and cell-cell contact events, effector cells were cultured while physically separated from target cells in transwell plates. Preventing cell-cell contact between effector and target cells completely abrogated the inhibitory effect of photodepletion-treated cells and also abolished the previously observed increase in IL-10 secretion (Figure 6AB). CTLA-4 being the prime ligand on Tregs for members of the B7 costimulatory molecules and a crucial mediator of immune tolerance,⁴⁶³⁻⁴⁶⁵ its expression was measured on Tregs from patients with GVHD. We found that CTLA4 was expressed on CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells after co-culture with photodepletion cells (data not shown). In addition, Treg inhibition of proliferation was abrogated by anti-CTLA-4 antibodies (Figure 6C, p<0.001, and Suppl. Figure 2), but neither by anti-GITR nor by irrelevant isotype matched antibodies. Interestingly, the addition of neutralizing antibodies directed against CTLA-4 completely abolished the 3-fold increase in the proportion (Figure 4A and 6 EF) and more than doubling of the number (Figure 4B and 6F) of Tregs resulting from the addition of photodepletion cells to untreated GVHD cells (Figure 6DEF; p<0.05). Thus, these results indicate that cell-cell contact is not only required for the inhibitory effect of photodepletion cells, but that it also represents an initiating event upstream of IL-10 secretion. In addition, these findings led to the identification of a crucial role for CTLA-4 in the inhibitory effect of photodepletion cells and in Treg production.

Injection of photodepletion exposed PBMC increase the proportion of Tregs in GVHD patients

To determine whether the increased number of Tregs documented in our studies performed ex vivo would translate into an increase in Treg numbers in patients with chronic GVHD treated with photodepletion cells, we measured Treg numbers in 5 patients enrolled in a

TH9402 photopheresis clinical trial. Patients were males with a mean age of 47.8 years old (range: 39-58), and had undergone a myeloablative (busulfan and cyclophosphamide (n=2), or total body irradiation with cyclophosphamide (n=2) or melphalan and etoposide (n=1)) allogeneic transplant with HLA matched sibling donors. These patients had chronic GVHD refractory to at least 2 immune suppressors, including steroids, and underwent weekly leukopheresis and photodepletion using TH9402 under a clinical protocol (unpublished observation). PBMC were analyzed at 0, 2, 4, and 8 weeks of treatment for their CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺FOXP3⁺ content. The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ cells remained stable, except for a slight increase in CD4⁺ cells after 8 weeks of treatment (figure 7A; p<0.05). However, the number of Tregs in these patients' peripheral blood increased rapidly after 2 weeks, and remained above pre-treatment levels and also healthy donor levels until week 8 (p<0.05). Interestingly, these 5 patients also demonstrated some improvement in their GVHD. Indeed, complete responses were observed in mouth, gastrointestinal tract, and skin, with 1 partial and 1 minimal response, the latter in lung GVHD. The increase in Tregs observed in vivo in GVHD patients suggests that reinfused Tregs can survive in vivo.

Discussion

In this study, we identified a novel photodepletion strategy with clinical potential for the treatment of patients with chronic GVHD. Indeed, we uncovered photodepletion conditions using TH9402 with the ability to specifically eliminate host-reactive T cells and preserve CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells with Treg activity in PBMC from patients with chronic GVHD. Such Tregs present in photodepletion -treated PBMC at the time of re-infusion have the potential to suppress the pro-GVHD activity of patient T cells that have not been exposed to photodepletion. Tregs from patients or healthy individuals escape photodepletion-induced elimination via P-glycoprotein-mediated dye efflux. Notably, Treg generation and activity required CTLA-4 binding, and was completely abrogated by prevention of cell-cell contact between photodepletion cells and untreated patient cells. We also showed that IL-10 secretion is a prime mechanism responsible for the inhibition of

GVHD patient cell proliferation, while other mediators such as TGF- β and GITR were not involved. Finally, we provide data supporting the rapid expansion of Tregs in patients re-infused with autologous photodepletion-treated PBMC.

The photodepletion inhibitory effect on untreated cell proliferation cannot be ascribed solely to the elimination of host-reactive T cells. The fact that TH9402 photodepletion preserved functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells clearly positioned Tregs as likely effectors of this inhibitory effect. In addition, depletion of CD4⁺CD25⁺ cells resulted in complete loss of the inhibitory effect of photodepletion exposed cells on both MLR activated and GVHD patient cells, a finding providing further support to the implication of Tregs. Moreover, the fact that the addition of cells killed by photodepletion did not impair the capacity of GVHD cells to proliferate indicated that the decreased proliferation was not attributable to a bystander effect resulting from soluble mediators or death signals from dying cells. Finally, adding back CD4⁺CD25⁺ cells completely restored the inhibition of proliferation lost upon the removal of Tregs. We thus conclude that the ability of photodepletion -treated PBMC from GVHD patients to inhibit the proliferation of untreated CD4 T cells is due to Treg enrichment.

Although a few human⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸ and murine^{446;469;470} studies have provided evidence for the implication of Tregs in the inhibition of alloreactivity in ECP using the photosensitizer 8-methoxypsoralen (8-MOP), this is the first study to look closely at the cellular and molecular mechanism by which Tregs surviving photodepletion can exert such cellular inhibition in the context of human chronic GVHD. The two most common hypotheses to explain Treg modulation of immune responses imply either secretion of the anti-inflammatory cytokines IL-10⁴⁷¹ and TGF- β ,⁴⁷² or cell-cell contact mediated by CTLA-4 or membrane-bound TGF- β .⁴⁷³⁻⁴⁷⁵ In the present study, we show that the addition of TH9402 photodepletion cells to untreated GVHD cells leads to increased IL-10 secretion, which causes their inhibitory effect as confirmed by IL-10 blocking experiments. As opposed to several studies where TGF- β was shown to play a pivotal role in the inhibitory effect of

Tregs,⁴⁷⁵ in the present study, neutralization of TGF- β did not alter photodepletion-induced inhibition. However, our results are consistent with the observation by Kullberg et al that CD4⁺ Tregs from SMAD3^{-/-} animals, whose TGF- β signaling pathway is impaired, are able to generate an immunosuppressive effect.⁴⁷⁶ Our study also demonstrates that IL-10 secretion is cell-cell contact dependent; indicating that IL-10 secretion does not result from a direct effect of photodepletion on PBMC. CTLA-4 being a receptor of major importance in Treg cell-cell contact and in cytokine-dependent inhibition,^{474;477} we investigated its role in TH9402 photodepletion-induced immune suppression. We found that CTLA-4 neutralization abrogated the inhibitory effect of photodepletion cells on the proliferation of host-reactive T cells. This finding is in agreement with the observation of decreased suppressive capacity in CTLA-4-deficient murine Tregs.⁴⁷⁸ Also, Bodor et al have shown in a murine model that CTLA-4 could mediate its inhibitory effect through induced cAMP early responder (ICER), a mechanism involving T-T cell interactions.⁴⁷⁹ Our results also associated CTLA-4 inhibition with a reduced frequency of Tregs. It will therefore be interesting to evaluate whether strategies to promote CTLA-4 signaling on Tregs will lead to the expansion of this cell population.

There are two main types of CD4 Tregs, FOXP3⁺ Tregs and IL-10-producing type 1 Tregs (Tr1 cells).⁴⁶¹ Our work clearly shows that photodepletion of PBMC leads to enrichment of FOXP3⁺ Treg cells. However, the fact that the Treg activity of photodepletion-treated cells is IL-10-dependent suggests that Tr1 may contribute to this Treg activity. In line with this idea, evidence suggests that human FOXP3⁺ Tregs induce the development of Tr1 cells in vitro.⁴⁸⁰ We could not directly address this question herein because there are no known specific cell-surface markers of Tr1 cells.⁴⁶¹ We speculate that Treg cells found in GVHD patients are of extrathymic origin. Tr1 always arise in the periphery when naïve CD4⁺ T cells are activated by tolerogenic antigen-presenting cells.⁴⁸¹ Though FOXP3⁺ Treg cells can be generated in the thymus and the periphery, several points lead us to speculate that those found in PBMC from GVHD patients are mostly if not exclusively of extrathymic origin. First, patients with active chronic GVHD present important thymic atrophy,

decreased thymic output, and peripheral lymphopenia.^{482,483} Second, the factors responsible for generation of FOXP3⁺ Tregs in the periphery coalesce in GVHD patients: lymphopenia-induced homeostatic T cell proliferation and production of TH1 cytokines enhances the generation of FOXP3⁺ T cells in the periphery.⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶ Generation of Tregs in the periphery is limited because CD4 Tregs are dependent on IL-2 produced by other CD4⁺ T cells.⁴⁸⁷ Thus, the CD4⁺ Treg population and the non-naïve IL-2 producing CD4 T cell population control each other. We therefore propose that supplementation with IL-2 after photodepletion could lead to further expansion of Tregs without accumulation of CD4 effector T cells.

Based on the results of the present study, a multicenter clinical trial of ECP using TH9402 for the treatment of patients with steroid refractory chronic GVHD has been initiated. In this study, circulating lymphocytes are collected by leukapheresis, exposed ex vivo to photodepletion, and reinfused into the patient. We surmised that the increase in Treg numbers observed in vitro would translate into the generation of Tregs in vivo. To test this hypothesis, we evaluated Treg populations in these patients and found that it increased at all 3 time-points evaluated after treatment initiation, suggesting that results from our studies performed ex vivo are relevant to the biology of Tregs in GVHD patients and translate into population changes in vivo. Treg increases were also observed after ECP using 8-MOP as photosensitizer. However, in these studies, the increase in Tregs was observed after approximately 9 weeks (6 treatment cycles), while TH9402 treatment led to an increase in Tregs as early as 2 weeks after treatment initiation.³⁰ Whether this rapid rise in Tregs could be explained by the infusion of Tregs preserved after TH9402 photodepletion, or by the generation of new Tregs remains to be determined. This result is in line with the ability of ECP to reverse experimental GVHD through a Treg-dependent mechanism in an animal model of acute GVHD,⁴⁴⁶ and is most encouraging for the implementation of a TH9402-based ECP process that would rely both on the elimination of immunoreactive cells and Treg generation. The latter may have particularly important clinical implications since the proportion of Tregs in peripheral blood was found to correlate with the incidence of

GVHD.⁴⁵⁴ Moreover, the demonstration, in the present study, that photodepletion has an impact on both endogenous host-reactive T cells and Tregs could have important biological implications. Indeed, immunoreactivity from non-circulating lymphocytes that inevitably escape exposure to photodepletion could be downmodulated immediately by Tregs surviving the photodepletion process and reinfused into the patient, and later by Tregs generated in vivo after cell-cell contact with photodepleted cells. This could explain why ECP has beneficial effects although it targets only 15 percent or less of total body lymphocytes. Such a strategy may represent a significant advance for the treatment of patients with chronic GVHD and other immunologic disorders.

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs. Francine Foss, Ronan Foley, Irwin Walker, Harry Atkins, Jean Roy, Silvy Lachance, Thomas Kiss, Lambert Busque, Guy Sauvageau and Marie Detrait for their help in the conception and implementation of the Phase I/II clinical trial of TH9402 ECP for the treatment of steroid-refractory chronic GVHD; Drs Martin Guimond and José Cohen for insightful comments on the manuscript; Jean Morin and the members of the Cellular Therapy Laboratory, Apheresis and Stem Cell Transplantation Units in Montreal, Ottawa, and Vancouver for their help with the procurement and preparation of human samples, as well as treatment of patients.

Authorship

Contribution: J.P.B., G.K. and D.C.R. designed the research; J.P.B. and M.R. performed the research; C.T. and M.R. contributed data; J.P.B. and G.K. analyzed data; S.C., C.S., D.S.A., D.H., R.M.E. and D.C.R. provided patient cells and reagents, J.P.B., G.K. and D.C.R. wrote the paper; D.C.R., C.S., S.C., R.M.E. and C.P. edited the paper.

Conflict-of-interest disclosure: D.C.R. has received research grant support from Kiadis Pharma. R.M.E. is an employee of Kiadis Pharma. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Denis Claude Roy, MD, Div. Hematology-Oncology, Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center, 5415 l'Assomption blvd., Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada; email:

References

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.
2. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*. 2002;100(2):406-414.
3. Pidala J, Anasetti C, Jim H. Quality of life after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009;114(1):7-19.
4. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood*. 2009;114(18):3956-3959.
5. Sabry W, Le Blanc R, Labbe AC et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with tacrolimus and mycophenolate mofetil in HLA-matched nonmyeloablative transplant recipients is associated with very low incidence of GVHD and nonrelapse mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(8):919-929.
6. Cutler C, Miklos D, Kim HT et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2006;108(2):756-762.
7. Couriel DR, Hosing C, Saliba R et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood*. 2006;107(8):3074-3080.
8. Flowers ME, Apperley JF, van Besien K et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;112(7):2667-2674.

9. Gatz E, Rogers CE, Clouthier SG et al. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood*. 2008;112(4):1515-1521.
10. Boumedine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy*. 2005;7(2):134-143.
11. Guimond M, Balassy A, Barrette M, Brochu S, Perreault C, Roy DC. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood*. 2002;100(2):375-382.
12. Mielke S, Nunes R, Rezvani K et al. A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood*. 2008;111(8):4392-4402.
13. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood*. 2002;99(9):3083-3088.
14. Roy DC, Lachance S, Kiss T et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation: High Doses of Alloreactive-T Cell Depleted Donor Lymphocytes Administered Post-Transplant Decrease Infections and Improve Survival without Causing Severe Gvhd [abstract]. *Blood*. 2009;114:512.
15. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106(8):2903-2911.
16. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144-1150.

17. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006;108(4):1291-1297.
18. Mielke S, Rezvani K, Savani BN et al. Reconstitution of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) after CD25-depleted allotransplantation in elderly patients and association with acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;110(5):1689-1697.
19. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2008;111(2):945-953.
20. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945-956.
21. Parkman R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol*. 1986;136(10):3543-3548.
22. Zhang Y, Hexner E, Frank D, Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2007;179(5):3305-3314.
23. Radojcic V, Pletneva MA, Yen HR et al. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *J Immunol*. 2010;184(2):764-774.
24. Allan SE, Broady R, Gregori S et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev*. 2008;223:391-421.

25. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol*. 2004;16(12):1769-1780.
26. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995;270(5238):985-988.
27. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-547.
28. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(1):129-138.
29. Biagi E, Di Biaso I, Leoni V et al. Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2007;84(1):31-39.
30. Di Biaso I, Di Maio L, Bugarin C et al. Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation*. 2009;87(9):1422-1425.
31. Jonson CO, Pihl M, Nyholm C, Cilio CM, Ludvigsson J, Faresjö M. Regulatory T cell-associated activity in photopheresis-induced immune tolerance in recent onset type 1 diabetes children. *Clin Exp Immunol*. 2008;153(2):174-181.
32. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A, Morita A, Peritt D, Scharz T. Experimental extracorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;181(9):5956-5962.

33. George JF, Gooden CW, Guo L, Kirklin JK. Role for CD4(+)CD25(+) T cells in inhibition of graft rejection by extracorporeal photopheresis. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27(6):616-622.
34. Hara M, Kingsley CI, Niimi M et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol.* 2001;166(6):3789-3796.
35. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26(5):579-591.
36. Manzotti CN, Tipping H, Perry LC et al. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002;32(10):2888-2896.
37. Read S, Greenwald R, Izcue A et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol.* 2006;177(7):4376-4383.
38. Andersson J, Tran DQ, Pesu M et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2008;205(9):1975-1981.
39. Kullberg MC, Hay V, Cheever AW et al. TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol.* 2005;35(10):2886-2895.
40. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004;34(11):2996-3005.

41. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-275.
42. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(4):884-895.
43. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*. 2002;196(2):247-253.
44. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006;212:28-50.
45. Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med*. 1999;189(8):1329-1342.
46. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2003;102(13):4600-4607.
47. Zhang H, Chua KS, Guimond M et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med*. 2005;11(11):1238-1243.
48. Bosco N, Agenes F, Rolink AG, Ceredig R. Peripheral T cell lymphopenia and concomitant enrichment in naturally arising regulatory T cells: the case of the pre-Talpha gene-deleted mouse. *J Immunol*. 2006;177(8):5014-5023.
49. Blais ME, Brochu S, Giroux M et al. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J Immunol*. 2008;180(4):2299-2312.

50. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol.* 2006;177(1):192-200.

Figure legends

Figure 1: Photodepletion (PD) cells display reduced proliferation and mostly a Treg phenotype. (A) PBMC from chronic GVHD patients (n=10) were exposed or not to photodepletion. Proliferation of GVHD cells was assessed by ^3H -thymidine incorporation after 5-day cultures in the presence of IL-2. (B) Three days after photodepletion, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells were evaluated by flow cytometry and activated and Treg cells discriminated by FOXP3 expression. Shown are representative examples and a compilation of 6 independent experiments \pm SD expressed in relative (C) and absolute (D) number. Clear bars and filled bars represent untreated (untx) and photodepletion-treated GVHD PBMC, respectively. $**p<0.01$ and $***p<0.001$

Figure 2: Photodepletion (PD) preserves functional Tregs. (A) $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cells from healthy donors were cultured with allogeneic MHC-mismatched cells for 5 days either alone or in the presence of autologous untreated (untx) or photodepletion-treated $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells (Tregs) from autologous donors. Proliferation was evaluated by measuring ^3H -thymidine incorporation (mean \pm SEM; n=5). (B) PHA-activated PBMC from healthy donors were exposed or not to photodepletion, and admixed with autologous PHA-activated PBMC. Three days later, CD4 and CD8 cell proliferation was determined by flow cytometry using EdU incorporation. Plot shown is representative of 3 independent experiments $**p<0.01$ and $***p<0.001$

Figure 3: Photodepletion cells from GVHD patients demonstrate Treg inhibitory activity. (A) Effector (E) PBMC from GVHD patients were exposed (filled bars) or not (clear bars) to photodepletion, and co-cultured at indicated ratios with target (T) PBMC from the same patient for 5 days. Proliferation was evaluated by measuring ^3H -thymidine incorporation. Bars represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. (B) Experiment similar to (A) at a 1:1 ratio where specific proliferation of CD4^+ cells was measured by incorporation of EdU. Shown are a representative and a compilation of 3 independent experiments (mean \pm SD) (C) Untreated, photodepletion exposed or $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$

depleted/photodepletion exposed PBMCs from GVHD patients were co-cultured at indicated ratios with autologous PBMC for 5 days. Proliferation was evaluated by measuring ^3H -thymidine incorporation (n=3). (D,E) PBMC from healthy donors were stimulated by MHC-incompatible PBMC at a 1:1 ratio, and exposed (filled) or not (clear bars) to photodepletion. Cells were either left untouched, depleted or repleted in $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells and placed into co-culture with equal numbers of MLR cells from the same donors for 5 days. (D) CD4^+ cell proliferation was assessed by EdU incorporation (mean \pm SEM) and (E) $\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+\text{IL-10}^+$ cells within the CD4^+ cell population (mean \pm SD) was estimated by flow cytometry. *p<0.05, and ***p<0.001

Figure 4: Exposure of GVHD patient PBMC to photodepletion cells increases Treg numbers. PBMC from GVHD patients were cultured with untreated (untx) or photodepletion (PD) exposed autologous PBMC at a 1:1 effector:target ratio. At days 1, 3 and 6 of co-culture, (A) percentages and (B) absolute numbers of FOXP3^+ cells were determined by flow cytometry (mean \pm SEM of 5 individual experiments). Black lines correspond to the addition of untreated PBMC and blue lines, the addition of photodepletion exposed PBMC. (C) Treg proliferation was evaluated by measuring Ki-67 expression (mean \pm SEM)) and (D) EdU incorporation (representative example) in $\text{CD4}^+\text{FOXP3}^+$ cells following the co-culture of GVHD patient cells with untreated (clear) or photodepletion exposed (filled bars) GVHD PBMC (3 independent experiments). (E) $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cells were isolated and exposed or not to photodepletion. Three days after photodepletion, surviving cells were characterized for the presence of FOXP3 . (F) $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ cells were isolated and stained with MitoTracker Deep Red. These cells were then cultured alone or with photodepleted $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cells, in the presence of IL-2, or irradiated histoincompatible PBMC and IL-2. (G) PBMC from GVHD patients were untreated, or exposed to photodepletion in the presence or absence of 50 μM verapamil. Survival of CD4^+ cells according to CD25 expression levels was assessed by 7-AAD staining. (H) GVHD PBMC either untreated (clear), exposed to photodepletion alone (filled) or exposed to photodepletion in the presence of verapamil (striped bars) were then

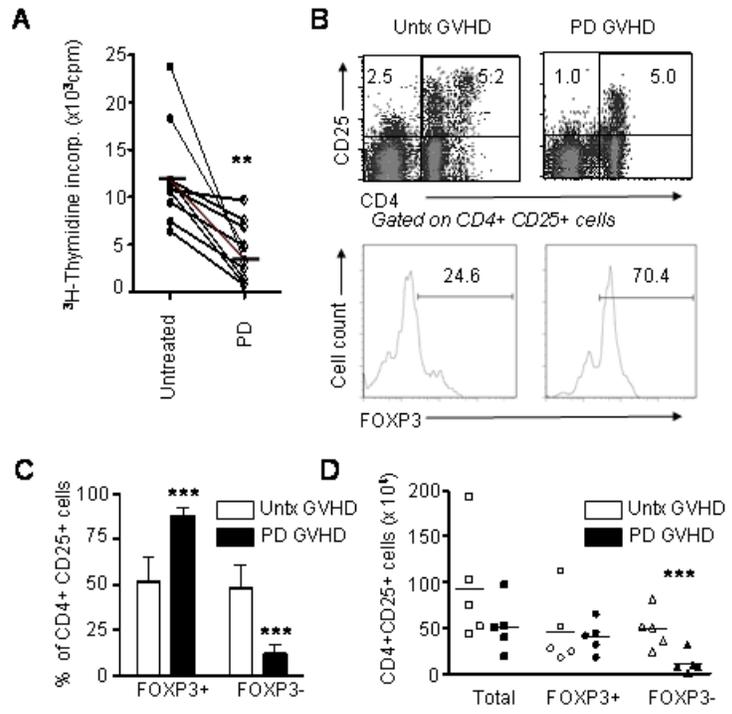
incubated with untreated autologous PBMC and proliferation assessed by measuring ^3H -thymidine incorporation. Bars represent mean \pm SEM of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus untreated targets alone (0:1) cells.

Figure 5: Increased IL-10 secretion after culture of photodepletion cells with untreated GVHD patient cells. GVHD patient PBMC were co-cultured with equal numbers of autologous untreated (clear) or photodepletion exposed (filled bars) PBMC. After 3 days of incubation, supernatants were collected, and (A) IL-10 and (C) soluble TGF- β levels determined by ELISA. (B and D) GVHD patient PBMC were cultured for 5 days with equal numbers of untreated (clear bars) or photodepletion exposed PBMC from the same patient in the absence (filled bars) or presence of neutralizing monoclonal antibodies directed against IL-10 (diagonal), TGF- β (checker) or an irrelevant antigen (striped bars) of the same IgG1 isotype, and cell proliferation was determined by measuring ^3H -thymidine incorporation. Bars represent mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$.

Figure 6: The inhibitory effect of photodepletion cells requires cell-cell contact and CTLA-4. (A) Photodepletion GVHD cells were physically separated from GVHD targets using transwell plates to prevent cell-cell contact, but not cytokine interaction. After 5-day cultures, proliferation of target cells exposed to untreated (clear) versus photodepletion treated (filled bars) cells was measured in a ^3H -thymidine incorporation assay and (B) IL-10 levels were measured in the supernatants using ELISA. Bars represent mean \pm SEM of 3 independent experiments. (C) PBMC from GVHD patients were cultured with untreated (clear bars) or photodepletion exposed PBMC from the same patient for 5 days in the absence (filled bars) or presence of monoclonal antibodies directed against CTLA-4, GITR or an irrelevant antigen. Proliferation in each of the above conditions was determined by measuring ^3H -thymidine incorporation (mean \pm SEM). (D) FOXP3 expression in CD4^+ cells was evaluated by flow cytometry after GVHD patient cells were cultured with autologous untreated cells, photodepletion treated cells, or photodepletion treated cells with

anti-CTLA-4 monoclonal antibodies. Results are expressed according to (D) the proportion of FOXP3⁺ cells within CD4⁺ cells and (E) the absolute number of CD4⁺FOXP3⁺ cells (Results are shown as mean ± SD). *p<0.05 and ***p<0.001.

Figure 7: Increased proportion of CD4⁺FOXP3⁺ cells in GVHD patients receiving photodepletion cells. Five patients suffering from corticosteroid refractory GVHD underwent weekly lymphophereses. Each cell collection was exposed to photodepletion and reinfused to the patient. Patient blood samples were obtained on weeks 0, 2, 4 and 8 for flow cytometry analysis of (A) CD4⁺ cells and CD8⁺ cells, and (B) FOXP3⁺ cells within the CD4⁺ subpopulation. For comparison, gray bars indicate results from 5 healthy donors (mean ± SEM). Mean±SEM of results from 5 patients; *p<0.05 and **p<0.01



Fi

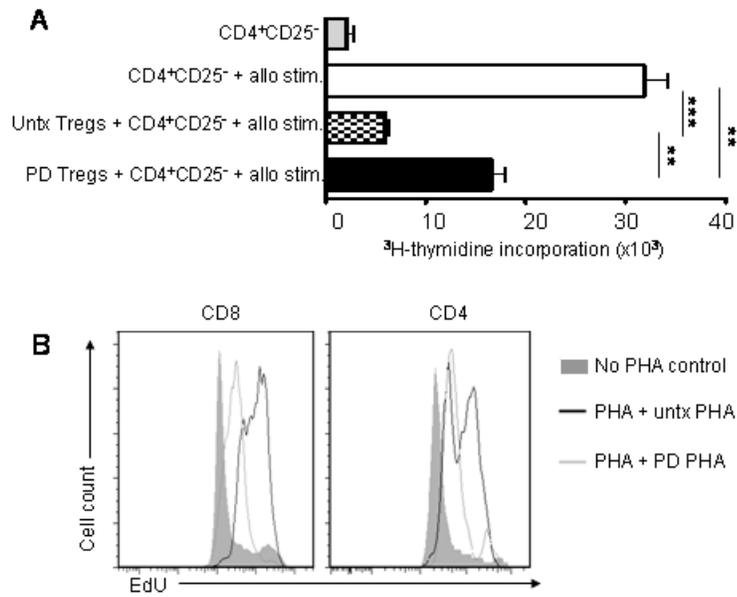


Figure 2

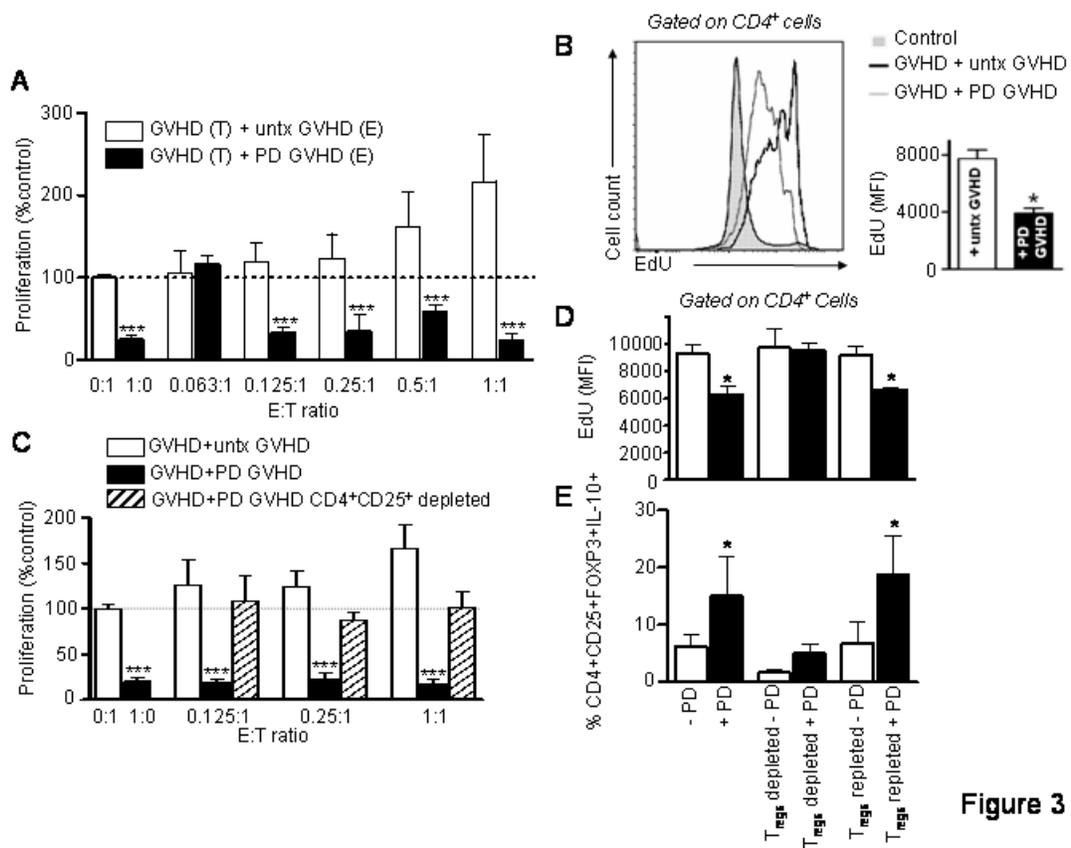


Figure 3

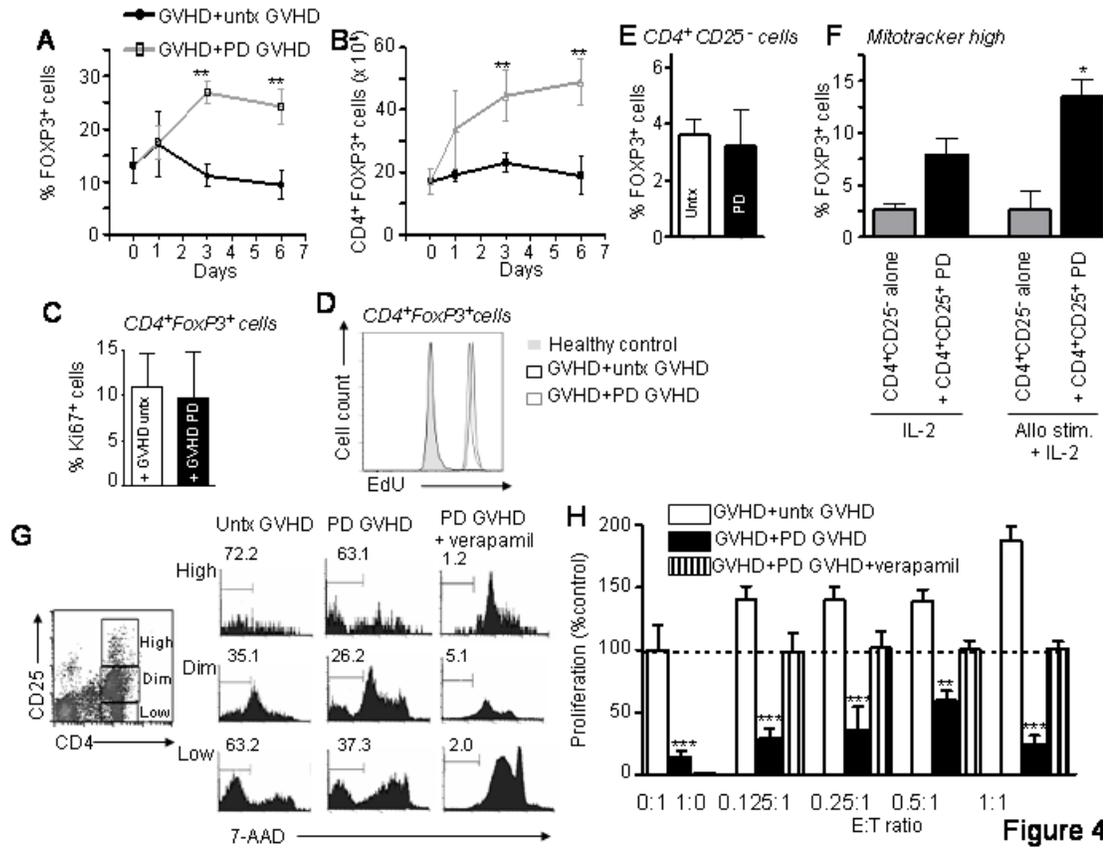


Figure 4

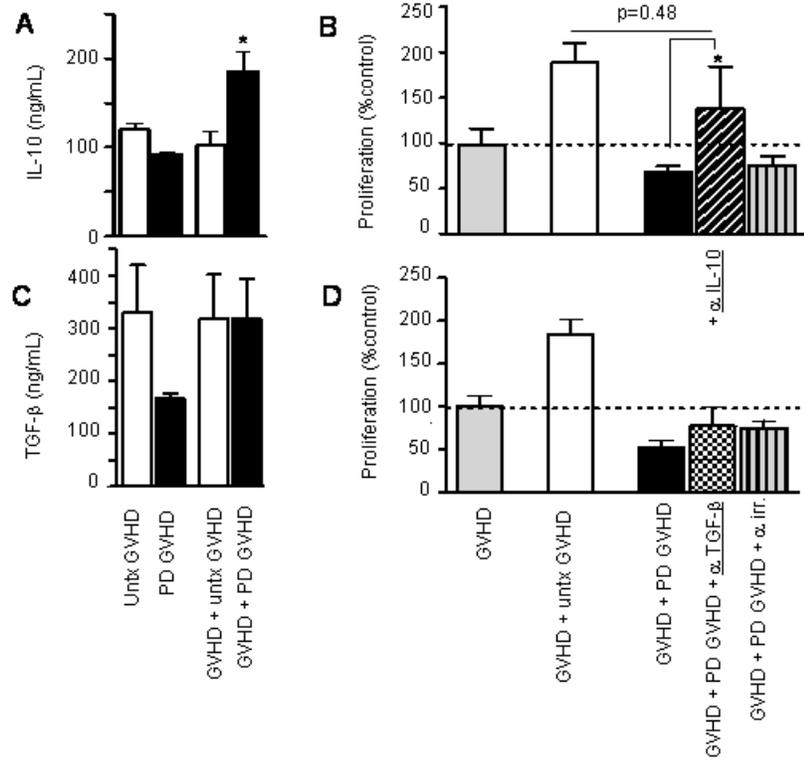


Figure 5

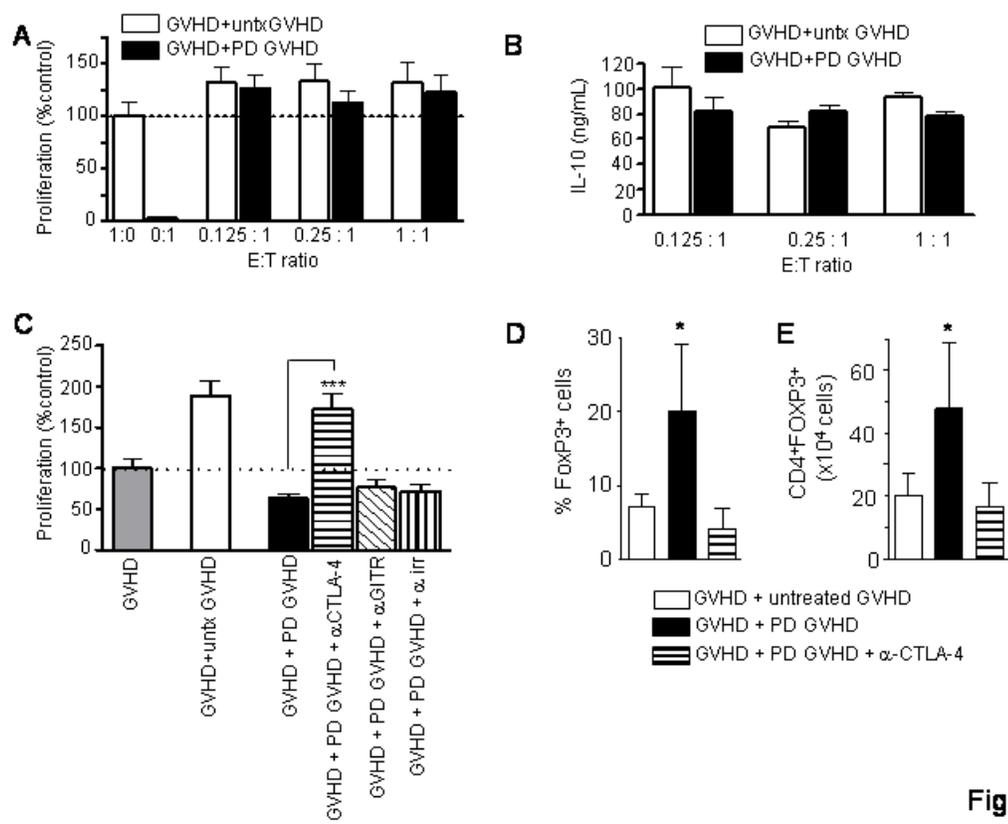


Figure 6

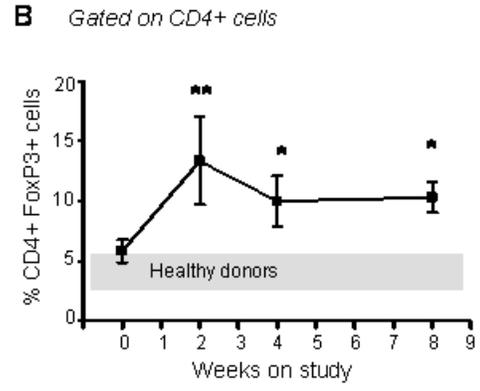
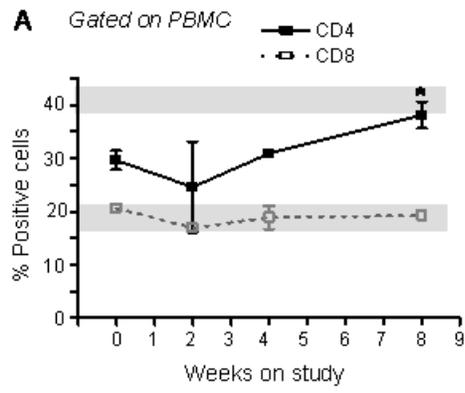


Figure 7

Chapitre 3 : Article 2

Article soumis au journal Nature Medicine
Septembre 2013

Dans le premier article, nous avons démontré que la photodépletion au TH9402 permettait une élimination sélective des cellules T actives tout en préservant les cellules Tregs. De plus, cette élimination permet une augmentation de la population Tregs dans nos cultures. De manière intéressante, cette augmentation de Tregs provient de la conversion de cellules T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ en Tregs et nécessite l'activité de CTLA-4. Dans l'introduction, nous avons discuté de la capacité de CTLA-4 à induire l'expression d'IDO dans les cellules présentatrices d'antigènes. De plus, nous avons également discuté du fait que la photodéplétion entraîne la mort des cellules T activées par induction d'espèces réactive de l'oxygène et que ceci permet non seulement l'induction d'IDO, mais également augmente son efficacité. Ceci nous entraîne à émettre l'hypothèse que cette augmentation de Tregs pourrait être dépendante d'IDO. Dans ce second article, nous allons étudier l'impact d'IDO dans le traitement de la cGVHD grâce à la photodéplétion au TH9402. De plus, pour cet article, nous avons eu accès à un plus grand nombre de patients et nous avons pu suivre la population Treg chez ces patients sur l'ensemble de l'étude.

CTLA-4-mediated IDO induction in Tregs: a novel mechanism of generation
and function of Tregs with implications for cGVHD treatment

Jean-Philippe Bastien,¹ Élise Cournoyer¹, Marie-Pier Giard¹, Radia Sidi Boumedine¹,
Vibhuti Dave,¹ Denis Claude Roy^{1,2,*}

¹Division of Hematology-Oncology, Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center,
Montreal, QC; ²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC;

Running title: Treg specific IDO induction and cGVHD therapy

Keywords: Regulatory T cells (Tregs), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), cytotoxic T-
lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), graft-versus-host disease (GVHD)

Manuscript information: Abstract 132 words (839 characters), main text 2874 words
(19149 characters), total references 34

*Corresponding author

Mailing address:

Denis Claude Roy, MD

Division of Hematology-Oncology

Hopital Maisonneuve-Rosemont Research Center

5415 l'Assomption Blvd

Montreal, Quebec H1T 2M4

Canada.

Telephone : 514-252-3400 ext 3331

Fax : 514-254-5094

ABSTRACT

Regulatory T cells (Tregs) play critical role in dampening inflammatory immune responses to self and non-self antigens. This suppressive ability of Tregs is crucial in controlling chronic graft versus host disease (cGVHD) following allogeneic stem cell transplant. In the present report we have investigated the contribution of Tregs in regulating cGVHD following TH9402 phototherapy. We provide evidence to show that TH9402 treatment of healthy donor- and cGVHD patients-derived peripheral blood resulted in induction of IDO in Tregs and this induction required CTLA-4 receptor-ligand engagement. Importantly, we show that Treg specific IDO induction resulted in the generation of induced Tregs (iTregs) from conventional CD4⁺ T cells in a cell-cell contact independent manner and these iTregs were functionally competent. Finally, elevated numbers of IDO expressing Tregs correlated with successful TH9402 treatment of cGVHD patients.

INTRODUCITON

Chronic graft versus host disease (cGVHD), like many immune diseases, is characterized by the failure of immunologic control by FoxP3 expressing CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs)(reviewed in⁴⁸⁸). In cGVHD, numerical deficiency of Tregs is suggested to cause this failure^{330-333;337;339;489;490}. We previously showed that TH9402-induced photodepletion of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from cGVHD patients selectively eliminates disease causing T cells^{434;437} but not Tregs⁴⁹¹. When infused into cGVHD patients the preserved Tregs induce graft tolerance without affecting anti-pathogen or graft versus leukemia (GVL) responses.

CTLA-4, a receptor for CD80/CD86 ligands, is constitutively expressed on Tregs and activated T cells and acts as a negative regulator of T-cell activation. In antigen presenting cell (APCs), particularly plasmacytoid dendritic cells (pDCs), engagement of CD80/CD86 by CTLA-4 induces indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression¹⁷³. IDO plays a pivotal role in immune regulation via the tryptophan degradation cascade and expression of GCN2.⁴⁹²⁻⁴⁹⁵ IDO expression is also induced in DCs by immunosuppressive agents such as HDAC inhibitors and vitamin D with promising result for GVHD prophylaxis^{494;495}. However, role for DCs in regulation of established GVHD remains unclear although reduced number of DCs is reported in GVHD patients⁴⁹⁶. IDO expressing pDCs have been shown to augment Treg numbers and function^{14,15}. In this context, no IDO-based therapy has been described for the treatment of GVHD in human and it is not clear if IDO induction in DCs or other cell subtypes can induce tolerance. In the present investigation, we show that IDO is also upregulated in Tregs in CD80/CTLA-4 dependent fashion, and importantly, this leads to the generation of functionally competent iTreg from conventional CD4+ T cells (Tcon). We discuss the implications of our finding in the context of GVHD.

RESULTS

TH9402-mediated photodepletion increases Treg population without affecting T cell number and response

The ability to enhance Treg number and activity would represent a major achievement in the treatment of patients with dysregulated immune disorders. However, promoting immune suppression by Treg could also induce loss of anti-infectious T cell response. We have evaluated in a Phase I/II clinical trial the efficacy of TH9402-mediated photodepletion of alloreactive T cells in PBMCs for the treatment of patients with refractory graft-versus-host disease (Fig. 1a). In this study, we found that while TH9402 treatment of PBMCs from cGVHD patients did not alter total lymphocyte numbers or CD4+ T cell counts (Fig. 1b, c), it led to an increase in the proportion and number of Tregs (Fig. 1d,e). This increase in Tregs was observed as early as 8 weeks after treatment initiation. Importantly, increase in Treg numbers did not result in loss of specific anti-viral response as measured by CD8 T cell reactivity against a human derived Cytomegalovirus, Epstein-Barr and influenza (CEF) peptide pool (Fig. 1f). Thus, TH9402-induced photodepletion augments Treg population in vivo without affecting total lymphocyte population or the anti viral response.

Photodepletion induces IDO expression in Tregs

We previously showed that TH9402-mediated photodepletion of PBMCs from cGVHD patients results in iTreg generation in a CTLA-4 dependent manner⁴⁹¹. CTLA-4 signaling has been shown to induce IDO expression¹³. Therefore, to elucidate the mechanism of iTreg generation by CTLA-4 signaling first we evaluated IDO levels in photodepleted PBMCs that were co-cultured or not with untreated PBMCs from the same cGVHD patient. Irrespective of culture conditions, IDO transcripts and proteins were specifically induced by TH9402 treatment of PBMCs compared to untreated (Fig. 2a-e) or 8-methoxypsoralen (8-MOP) treated PBMCs from cGVHD patients (Supplementary Fig. 1a). In agreement with enhanced IDO activity, tryptophan/kinurenine ratio was significantly reduced in culture supernatants of photodepleted cells, and this ratio could be reversed by 1-MT mediated inhibition of IDO activity or by blocking CTLA-4 signaling (Fig. 2f). Interestingly, the proportion of GCN2 expressing Tcon increased as tryptophan /kynurenine ratios decreased,

with corresponding effects of 1-MT or anti-CTLA-4 treatment, confirming effects of IDO activity on Tcon (Fig 2g).

To determine if photodepletion induced IDO expression in DCs, we analyzed these cells in freshly isolated and photodepleted PBMCs of cGVHD patients. Surprisingly, photodepletion and co-culture these PBMCs did not show any increase in IDO expression in pDCs (CD123+) or mDCs (CD11c+) (Fig. 2h,i). Furthermore, we noted decrease in frequencies of pDC, mDC1, mDC2 in freshly isolated PBMCs from cGVHD patients compared to healthy individuals (supplementary Fig 2). This unexpected finding prompted us to determine if photodepletion induced IDO expression in other immune cells of PBMCs from cGVHD patients. Unexpectedly, we readily detected IDO expression in Tregs and, importantly, the frequency of IDO expressing Tregs was significantly increased following co-culture of photodepleted PBMCs of cGVHD patients (Fig. 2i, j). IDO expression in FoxP3+ Tregs was ascertained by confocal microscopy (Fig 2k). As well, we detected higher CD80, a CTLA-4 ligand, expression on Tregs compared to Tcon (supplementary Fig. 2b, c) and importantly, blocking CTLA-4/CD80 ligation resulted in loss of IDO expressing Tregs in the co-culture of photodepleted PBMCs of cGVHD patients (Fig. 2j). These data strongly suggest that TH9402-mediated photodepletion of PBMCs from cGVHD patients induces IDO expression specifically in Tregs in a CTLA-4 dependent manner.

IDO expression in photodepleted PBMCs is required for functional iTreg generation

We previously showed that Treg number is increased in cGVHD patients following infusion of TH9402 treated PBMCs¹² and since this treatment resulted in IDO induction in Tregs, we wondered if IDO expression played any role in iTreg generation. To this end, we assessed the impact of inhibition of IDO activity or expression on the proportion and number of Tregs in co-culture of photodepleted PBMCs of cGVHD patients. Indeed, inhibiting IDO activity/expression by 1-MT, siRNA or anti-CTLA-4 antibody abrogated iTreg generation in co-culture of photodepleted PBMCs of cGVHD patients (Fig. 3a, b, and supplementary Fig. 3a). Further, the frequency of IL-10 expressing Tregs and conventional

T cells increased following co-culture and this increase was attenuated by anti-IDO effect of anti-CTLA-4 antibody or 1-MT (Fig. 3c, supplementary fig4). In addition, suppression of Tcon proliferation was relieved by impaired IDO expression or activity (Fig. 3d,e). This loss of anti-proliferative effect was also observed when lower ratio of IDO siRNA treated photodepleted cells to Tcon was used suggesting that IDO induction enhances Treg suppressor activity (Supplementary Fig. 3b). Collectively, these results indicate that generation of functionally competent iTregs in co-culture of photodepleted PBMCs requires CTLA-4/CD80-induced IDO expression.

While induction of IDO following photodepletion of PBMCs was critical for iTreg generation, we wondered if this phenomenon required cell-cell contact or IDO could function in a paracrine fashion. To this end, Tcon isolated from healthy donors (to ensure that these cells were as naïve as possible) and photodepleted PBMCs from cGVHD patients were cultured in a transwell (supplementary Fig. 3c). We detected a significant number of iTregs among Tcon population when co-culture of photodepleted PBMCs from cGVHD patients was present in the adjoining chamber. Interestingly, both untreated and photodepleted PBMCs alone from cGVHD patients also resulted in iTreg generation, demonstrating basal IDO activity in both conditions, albeit at reduced frequency compared to co-culture condition (Fig. 3f). The conversion of Tcon into iTregs was abolished in the presence of 1-MT or tryptophan (Fig. 3f) indicating that secreted IDO could mediate iTreg generation in transwell experiment. The iTregs generated in transwell experiment suppressed proliferation of MLR-activated CD4⁺ T cell to the same extent as freshly isolated Tregs (Fig 3g and supplementary Fig. 3d). These results indicate that cell-cell contact is not required for IDO dependent iTreg generation.

IDO expressed by Tregs is required for anti-cGVHD effect of photodepleted cells

The data described above suggests a role for IDO in iTreg generation. However, they do not indicate if IDO expression contributes directly to Treg function or only through modulation of other cell types. To address this question, first we determined the capacity of IDO-depleted purified CD4⁺CD25⁺ T cells from cGVHD patients to suppress proliferation of Tcon. Figure 4a shows that siRNA-mediated IDO depletion in Tregs resulted in loss of

suppression of Tcon proliferation. In fact, increasing the number of IDO-depleted CD4+CD25+ T cells also did not suppress proliferation of Tcon (Fig. 4b; increased proliferation at higher ratio likely reflects proliferation of activated CD4+CD25+ non Treg cells as well as CD4+CD25- T cells). We then evaluated the contribution of IDO in Treg-mediated anti-cGVHD effects of photodepleted cells. To this end, IDO was depleted or not in isolated CD4+CD25+ T cells from PBMCs from cGVHD patients and then returned to bulk PBMCs prior to TH9402-induced photodepletion. As expected, co-cultures of photodepleted PBMCs with IDO siRNA but not scrambled siRNA treated CD4+CD25+ T cells resulted in higher proliferation, reduced frequency of IL-10 expression in CD4+CD25+ T cell subset and decreased frequency of Treg (Fig. 4c,d,e). Interestingly, IDO depleted FOXP3+ Tregs expressed increased levels IFN- γ (supplementary figure 6). Further, siRNA-mediated depletion of GCN2 in total CD4+ T cells isolated from cGVHD patients followed by photodepletion and co-culture showed comparable loss in the anti-cGVHD responses of photodepleted cells (Fig. 4f,g,h). Collectively, these results strongly suggest that IDO induction in Tregs following TH9402 phototherapy is critical for anti-cGVHD effects of photodepleted cells.

IDO induction in Treg from health donors and its impact on iTreg generation

The observed CTLA-4-dependent induction of IDO expression in Tregs under the conditions of photodepletion of PBMCs from cGVHD patients raises critical question: could Tregs from healthy donors be modulated to express IDO as well, and if so whether this results in the generation of iTreg? To address this question, Tregs from healthy donors were isolated and exposed or not to CTLA-4-Ig. Indeed, CTLA-4-Ig treatment resulted in IDO expression in Tregs but not Tcon isolated from healthy donors (Fig. 5a, b). It is worth noting that Tregs express higher basal level of IDO compared to Tcon and that this level is increased further by CTLA-4-Ig treatment (Fig. 5b). The lower tryptophan/kynurenine ratio in Tregs but not Tcon culture following CTLA-4-Ig exposure confirmed that the induced IDO was biologically active (Fig. 5c). Furthermore, Tregs exposed to CTLA-4-Ig showed, compared to those not exposed, greater suppression of proliferation of MLR-activated CD4+ T cells (Fig. 5d). These data strongly suggest that IDO can be induced in Tregs

through a CTLA-4 dependent manner and that this IDO induction plays important role(s) in Treg generation and function.

To determine if CTLA-4-Ig induced IDO expression in healthy Tregs enabled iTreg generation in a cell contact independent manner, healthy donor-derived Tcon and Treg cells were cultured in transwell (Supplementary Fig. 7a). Addition of Tregs alone in the lower compartment resulted in appearance of iTregs in Tcon population compared to control media (Fig 5e). Importantly, CTLA-4-Ig ligation of Tregs led to further increase in iTreg frequency in Tcon population, and this iTreg generation was reversed by inhibiting IDO induction/activity in the presence of anti-CTLA-4 or 1-MT or tryptophan in culture media (Fig. 5e). This increase of iTreg number in Tcon population was not due to enhanced proliferation and/or survival of FoxP3⁺ cells (Supplementary Fig. 7c,d,e). To show that IDO induction in Tregs rather than target CD4⁺ T cells was necessary for iTreg generation, the transwell experiment was performed in the presence of GCN2- or IDO siRNA treated Tcon cells (Supplementary Fig. 7b). As expected, iTreg generation was impaired in GCN2 depleted but not control Tcon population in the presence of CTLA-4-Ig treated Tregs in lower chamber (Fig. 5f). Interestingly, IDO depletion in Tcon had no effect on iTreg generation by CTLA-4-Ig signalled Tregs in transwell experiments (Fig 5f). As expected, CTLA-4-Ig treated Tcon did not induce Treg phenotype in transwell experiments. Collectively, these data strongly suggest that CD80/CTLA-4 ligation-mediated IDO induction in Tregs is critical for converting healthy CD4⁺ T cells into functionally competent iTregs.

Contribution of Tregs and pDCs in generating iTregs

Since IDO is expressed in other immune cells, particularly dendritic cells that are present throughout the body, we considered the possibility that these cells could also induce iTreg generation in an IDO dependent manner. To this end, we evaluated the capacity of different DCs and B cells to induce FoxP3 expression in Tcon in the presence of CTLA-4-Ig. We noticed that CTLA-4-Ig ligation of pDCs (differentiated from monocytes) but not mDCs or B cells resulted iTreg generation from Tcon (Fig 6a). Flow cytometry staining showed IDO induction in pDCs following CTLA-4-Ig ligation (Fig. 6b,c). The pDCs mediated iTreg

generation was not due to preferential proliferation, and required IDO and GCN2 activity (Supplementary Fig. 8). Interestingly, culturing pDCs and Tregs together in the absence of CTLA-4-Ig was found to be sufficient to generate iTreg from Tcon population and this conversion was abrogated when IDO activity was inhibited by anti-CTLA-4 antibody, 1-MT or by adding tryptophan to the culture media in a transwell assay (Fig. 6d). Similarly, culturing pDCs in the presence of photodepleted PBMCs from cGVHD patients resulted in generation of iTreg. This requires the presence of Tregs in the photodepleted cells (Fig 6f). These data suggest that Treg:pDC interaction and subsequent tryptophan deprivation in culture supernatant is sufficient for iTreg generation from Tcon and this process is augmented by photodepletion of PBMCs isolated from cGVHD patients.

The above described results raise an important question about relative ability of Tregs and pDCs in generating iTregs. To this end, first we measured basal and CTLA-4-Ig-induced IDO activity in both cell types by evaluating tryptophan/kynurenine ratio. Strikingly, compared to pDCs, Tregs showed significantly lower tryptophan/kynurenine ratio even in the absence of CTLA-4 signaling reflecting higher basal IDO activity in Tregs than pDCs; CTLA-4 signaling increased IDO activity in both cell types (Fig. 6e). In agreement with IDO expression profile, Tregs were more efficient in generating iTregs even in the absence of CTLA-4-Ig ligation compared to CTLA-4 signaled pDCs (fig 6f). These data suggest that iTreg generation by IDO induction in Treg, compared to pDCs, may be a dominant pathway.

IDO expressing Tregs can be found in vivo and correlate with response to TH9402

We showed that the frequency of Tregs is increased in vivo in cGVHD patients undergoing photodepletion treatment with TH9402. To determine if this correlates with increased number of IDO expressing cells, we evaluated the frequency of IDO expressing CD4+CD25+FoxP3+ Tregs in these patients. Interestingly, we observed an increase and decrease in frequency and absolute number of IDO expressing Tregs in responding and non-responding patients, respectively (Fig. 6g, h). These results indicate that IDO induction in Tregs may be an important mechanism of generating iTregs in vivo in cGVHD patients undergoing successful TH9402 phototherapy.

DISCUSSION

Treg-based therapy has been proposed for GVHD treatment. However, a major impediment to this mode of treatment is the presence of insufficient number of Tregs in PBMCs. Thus there is a need to develop safe and efficient methods for generating Tregs in vitro for treatment of GVHD. The use of TH9402 based phototherapy has been reported in the context of GVHD prevention following haplo-identical stem cell transplantation and we previously reported that the phototherapy results in increase in Tregs. Here, we have elucidated the mechanism underlying this increase in Tregs. Our data show that TH9402 treatment of PBMCs resulted in increase in Tregs in cGVHD patients without affecting anti-viral. Importantly, we show that TH9402 treatment induced IDO in Tregs and that this induction resulted in the generation of iTreg. We also show that newly converted Tregs were phenotypically and functionally efficient.

In a study of cohort of cGVHD patients, the presence of IDO expressing CD4+ T cells correlated with favorable outcome for the patient⁴⁹⁷. We also observed that the increase of IDO expressing Tregs correlated with patients' outcome. TH9402 photodepletion can thus be used as a tool to increase this population. Furthermore, this increase may be used as a predictive value for patients' response, allowing for better patient support during the treatment. The ability of IDO expressing Tregs from healthy donor to induce conversion of CD4+CD25- T cells into iTregs suggest that this is likely a common phenomenon and that TH9402 treatment may augment this phenomenon. Whether iTregs generated in an IDO dependent manner also regulate immune activation in auto-immune diseases or cancer remains to be studied. Conversely, the inhibition of the immune suppression and pro-tumor function of IDO with the use of 1-MT^{173;175} is widely used for tumor immunotherapy^{177;498;499}. Since the ability of IDO expressing Tregs to generate iTregs is impaired by tryptophan, it may be worth exploring the possible effects of tryptophan on cancer immunotherapy.

Given that IDO is also induced in APCs^{494;495;500;501}, we cannot discard the role for IDO expression by APC. However, in the present studies we observed much higher basal IDO expression in Tregs than pDCs, and CTLA-4-Ig ligation further increased IDO expression

in both cell types. Further, APCs numbers in the peripheral blood of cGVHD patients have been shown to be reduced and thus, may not be an important source of IDO required for iTreg generation. Thus, Tregs that express higher basal IDO levels and induce conversion of Tcon to Tregs may be an important mechanism of tolerance induction in an IDO-dependent manner.

Taken together, these results indicate that TH9402 photodepletion could be used as a part of a therapeutic strategy to increase of Tregs in cGVHD. We also uncovered mechanism of Tregs-mediated anti-GVHD effects of photodepleted cells. This observation could translate in the refinement of techniques implying reduction of lymphopheresis frequencies and infusion of Tregs. However, to further optimize the treatment, interaction between Tregs and other cell populations implicated in cGVHD such as B cells and CD8 T cells in the context of TH9402 photodepletion requires further studies.

MATERIALS AND METHODS

Patients and healthy donors

PBMCs were obtained from healthy human subjects or patients suffering from cGVHD following allogeneic stem cell transplantation. Consent was obtained from all PBMCs donors and the study was approved by the ethic committee.

Photodepletion of PBMCs

Eight weekly followed by 8 bi-weekly leukaphoresed PBMCs from transplant patients were treated with TH9402 as described previously⁴⁹¹.

For full methods please see supplementary methods.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Transfusion of TH9402-induced photodepleted PBMCs into cGVHD patients does not affect T cell numbers or response (a) Schematics of TH9402 photodepleted PBMCs transfusion into cGVHD patients in an ECP manner. Frequencies of total lymphocytes (b) and CD4⁺ T cells (c) healthy donors (HD) and in blood of cGVHD patients were measured at 0, 8 and 20 week post transfusion. Frequency (d) and absolute (e) number of Treg cells was determined by intracellular FoxP3 staining for CD4⁺CD25⁺ T cells followed by flow cytometry. (f) To assess anti-viral response PBMCs from cGVHD patients at the indicated time post transfusion were cultured in the presence of a pool of 32 viral peptides, antibodies to CD28 and CD49d, and brefeldin A, and 5hrs later stained for surface and intracellular proteins and analyzed by flow cytometry. (* $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$)

Figure 2: Photodepletion mediated by TH9402 induces IDO expression in Tregs and requires CTLA-4 signaling. Induction of IDO and frequency of IDO⁺ cells in photodepleted PBMCs from cGVHD patients was assessed by Q-PCR (a), Western blot (b and c) and flow cytometry (d and e). IDO activity was assessed by measuring ratio of tryptophan to kynurenine levels in the culture supernatants in the presence or absence of 1-MT or anti-CTLA-4 antibody (f) and was further confirmed by determining the frequency of GCN2⁺CD4⁺ T cells (g). IDO expression and frequency of IDO⁺ cells in PBMCs, co-cultured with photodepleted PBMCs or not, from cGVHD patients was analyzed in CD123⁺, CD11c⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells by flow cytometry (h-j). A representative two color dot plot for CD123⁺ and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (h) cells in the absence (left panels) or presence of photodepleted PBMCs (right panels) is shown. (i) and (j) show average frequency of IDO expressing CD123⁺, CD11c⁺ and CD4⁺FoxP3⁺ cells in five independent experiments. (k) IDO expression by Tregs was confirmed by immunofluorescence. (l) To show that IDO induction in Tregs was specifically mediated by CTLA-4 signaling, cGVHD patients' PBMCs were treated or not with TH9402 and cultured in the presence of PBMCs from the same patient for 5 days in the presence or

absence of α -CTLA-4 or α -IFN γ . The proportion of IDO expressing Tregs was assessed by flow cytometry. (* p= <0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001).

Figure 3: IDO is required for expansion and function of Tregs following TH9402 induced photodepletion. PBMCs from cGVHD patients were cultured either alone or in the presence of photodepleted PBMCs from same patients for 5 days in the presence or absence of molecules that inhibit IDO expression or activity. Flow cytometry was performed to estimate (a) the frequency and (b) the absolute number of Tregs (CD4+CD25+FoxP3+). (c) Following co-culture and restimulation with PMA/ionomycin, the proportion of IL-10 expressing CD4+CD25+ T cells was evaluated by flow cytometry. (d) PBMCs from cGVHD cells were unexposed or exposed to either scramble or IDO siRNA prior to TH9402 induced photodepletion, co-cultured for 5 days and pulsed with 3 H thymidine for determining total cellular proliferation. (e) CD4+ T cell proliferation was studying by measuring EdU incorporation in co-culture of photodepleted PBMCs in the presence or absence of anti-CTLA-4 antibody or 1-MT. (f) To elucidate if cell-cell contact was required for conversion of CD4+ T cells into Tregs following photodepletion, freshly isolated CD4+CD25- cells were cultured in the upper well of a transwell plate, whereas untreated and/or photodepleted PBMCs from cGVHD patients were added to the bottom well of the plate. IDO activity was inhibited by adding 1-MT or exogenous tryptophan to the traswell culture. The frequency of FoxP3+ T cells in the upper chamber of transwell was measured by flow cytometry. (g) Functionnal assay of IDO induced Tregs and freshly isolated CD4+CD25+ Tregs healthy donor. Isolated Tregs were put in the presence of MLR activated T cell and proliferation from the same donor was measured by EdU incorporation.

Figure 4: IDO expression in Tregs is essential for optimal inhibitory function of photodepleted PBMCs from cGVHD patient. (a) Requirement of IDO expression in Tregs suppressor function was elucidated by transfecting CD4+CD25+ T cells isolated from cGVHD patients with scrambled or IDO specific siRNA. The transfected cells were then cultured in the presence of previously MLR activated autologous CD4+CD25- at a 1:1 ratio and CD4+ T cell proliferation was assessed by EdU incorporation. (b) Effect of IDO depletion on Treg suppressor function was determined at lower CD4+CD25+: CD4+CD25-

cell ratio. (c-e) CD4+CD25+ T cells from cGVHD patients were isolated and transfected with scrambled or IDO specific siRNA. Cells were then added back to bulk cGVHD cells before undergoing or not photodepletion. Autologous PBMCs were then cultured either alone or in the presence of photodepleted cGVHD cells for 5 days. (c) EdU incorporation into CD4+ T cells, (d) frequency of IL-10 expressing CD4+ T cells and (e) frequency of FoxP3 expressing cells was evaluated. (f-h) Similarly, CD4+CD25- T cells from cGVHD patients were isolated and transfected with scrambled or GCN2 specific siRNA. Cells were then added back to bulk cGVHD cells before undergoing photodepletion. PBMCs from cGVHD patients were then cultured either alone or in the presence of photodepleted cGVHD cells for 5 days. (f) EdU incorporation into CD4+ T cells, (g) frequency of IL-10 expressing CD4+ T cells and (h) frequency of FoxP3 expressing cells was evaluated.

Figure 5: Tregs from healthy donors can be modulated to express IDO. CD4+CD25+ cells from healthy donors were isolated and cultured in the presence or absence of CTLA-4-Ig and IDO expression was analyzed by Q-PCR (16 hr post-culture) in total PBMCs (a). IDO expression was analyzed by flow cytometry after 3 days post-culture in Tregs and non Tregs; shown are a representative example (Left panel) and a compilation (right panel) of 5 independent experiments. (c) IDO activity was assessed by measuring tryptophan and kynurenine levels in culture supernatants and expressed as tryptophan/kinurenine ratio. (d) The ability of CTLA-4-Ig signalled CD4+CD25+ T cells from healthy donor to suppress proliferation of MLR activated CD4+CD25- T cells was studied by measuring EdU incorporation and expressed as mean fluorescent intensity (MFI) for CD4+CD25- T cells. Panel (e) shows frequency of Tregs generated from CD4+ conventional T cells in transwell experiment where freshly isolated CD4+CD25- T cells from healthy donors were cultured in the upper chamber and Tregs exposed or not to CTLA-4-Ig were placed in lower chamber. IDO-induced generation of Tregs in transwell experiment was disrupted by adding α CTLA-4, 1-MT or tryptophan to the culture media. (f) Freshly isolated CD4+CD25- cells were either untreated or transfected with scrambled (scr), GCN2 or IDO

siRNA. Cells were then cultured in the upper chamber of transwell plate, whereas Tregs isolated from healthy donor were placed in lower chamber in the presence or absence of CTLA-4-Ig. Appearance of FoxP3 expressing T cells in the upper chamber was evaluated by flow cytometry.

Figure 6: IDO expressing Tregs are better than IDO expressing pDCs in generating induced Tregs and frequency of IDO expressing Tregs in cGVHD patients correlates with response to TH9402 photodepletion treatment. (a) The ability of monocyte-derived pDCs, or mDCs or B cells to induce Tregs was determined by activating or not these cells in the presence of CTLA-4-Ig for 48hrs followed by co-culture with CD4+CD25- T cells. Five days post co-culture, the frequency of FoxP3+ T cells was estimated by flow cytometry. IDO activity was blocked in the presence of 1-MT. (b) A representative histogram is shown for IDO expression in CD123 expressing cells after 2 day culture in the presence or absence of CTLA-4-Ig by flow cytometry; panel (c) shows average frequency of IDO expressing CD123+ cells and standard deviation from 5 independent experiments. (d) T cell-pDCs contact independent generation of FoxP3+ T cells was determined by culturing CD4+CD25- T cells in the upper chamber and monocytes-derived pDCs in the bottom chamber in the presence of allo-derived Tregs. IDO induction/activity was inhibited by anti-CTLA-4 antibody, 1-MT or exogenous tryptophan. The frequency of FoxP3 expression in the CD4+CD25- population was determined by flow cytometry. (e) The IDO activity in pDCs and Tregs cultured either alone or in the presence of CTLA4-Ig was assessed by determining ratio of tryptophan/kynurenine in culture supernatants. (f) Relative contribution of Tregs and pDCs in generating iTregs was determined by culturing CD4+CD25- T cells in the upper chamber and allo DCs in the bottom chamber of transwell. To the bottom chamber, bulk, Treg depleted, photodepleted or photodepleted Treg depleted PBMCs were added. The frequency of FoxP3+ T cells in the upper chamber was determined by flow cytometry. The frequency (g) and absolute number (h) of IDO expressing Tregs was evaluated in blood of cGVHD patients at 0, 8, and 20 week post TH9402-based photodepletion therapy.

Supplementary figure 1: The expression of IDO by Tregs following photodepletion using TH9402 is TGF- β independent and restricted to TH9402. PBMCs from cGVHD patients were treated or not with TH9402 and co-cultured in the presence of PBMCs from the same patient for 3 days in the presence or absence of TGF- β blocking antibody or recombinant TGF- β . Levels of FOXP3 expression within CD4⁺ subset (a) and IDO expression within FOXP3⁺ subset was evaluated by flow cytometry. (c) cGVHD patients' PBMCs were treated or not with 8-MOP and co-cultured in the presence of PBMCs from the same patients for 3 days. IDO expression was assessed by flow cytometry.

Supplementary Figure 2: IDO expression by Tregs is increased in cGVHD patients. IDO expression within CD4⁺ FOXP3⁺ subset from healthy donors (HD), untreated cGVHD patients or co-culture of cGVHD patients with photodepleted cells from the same patients was evaluated by flow cytometry. Shown is a compilation of 3 independent experiments.

Supplementary Figure 3: Analysis of CD80 expression on Tregs and frequency of APCs in cGVHD patients. (a) CD80, a ligand for CTLA-4, expression was assessed in CD4⁺FoxP3⁺ and CD4⁺FoxP3⁻ T cells by flow cytometry. Shown is the proportion of CD80 expressing Tregs and non Tregs (b) and mean fluorescent intensity (MFI) of CD80 on the two subsets of CD4⁺ T cells. (c) Total total pDC, (d) mDC1, (e) mDC2 and (f) monocytes were monitored by flow cytometry in blood of TH9402 treated cGVHD patients on 0, 8 and 20 week post-treatment.

Supplementary figure 3: IDO is required for anti-GVHD effect of photodepleted cells. (a) IDO expression was analyzed in PBMCs co-cultured or not with photodepleted PBMCs and transfected with scrambled or IDO specific siRNA. (b) Scrambled or IDO siRNA transfected PBMCs from cGVHD patients were photodepleted and cultured at indicated ratio with activated CD4⁺ T cells. Total proliferation was assessed by ³H thymidine incorporation and CD4⁺ T cell proliferation was assessed by EdU incorporation. (c) Schematic of transwell assay. (d)) CD4⁺CD25⁺ iTregs were isolated from transwell

cultures (Fig. 3g) and their capacity to suppress alloreactive T cell proliferation was measured by EdU incorporation at the indicated iTregs to T cell ratios.

Supplementary figure 4: Co-cultures of photodepleted with cGVHD allows for increased IL-10 expression by FOXP3 Tregs. IL-10 and IFN- γ expression within CD4+FOXP3+ subset in untreated cGVHD, photodepleted, co-cultures of photodepleted and untreated in the presence or absence of 1-MT was evaluated by flow cytometry. Shown is a representative example and a compilation of 3 independent experiments.

Supplementary figure 5: Tryptophan degradation is necessary for Treg induction and IL-10 secretion. (a) PBMCs from cGVHD patients were cultured alone or in the presence of photodepleted PBMCs in the presence or absence of PCPA (inhibitor of tryptophan hydroxylase that degrades tryptophan into serotonin) or 1-MT (inhibitor of IDO that degrades tryptophan into kynurenine) for 5 days. The frequency of Tregs (a) and IL-10 expressing CD4+ T cells (b) in individual culture were determined by flow cytometry. (c) CD4+ T cell proliferation was determined by EdU incorporation assay.

Supplementary figure 6: IDO inhibition leads to increased expression of IFN- by FOXP3 Tregs. CD4+CD25+ T cells from cGVHD patients were isolated and transfected with scrambled or IDO specific siRNA. Cells were then added back to bulk cGVHD cells before undergoing photodepletion. IFN- and IL-17 expression within CD4+FOXP3+ subset was evaluated by flow cytometry. Shown is a representative example and a compilation of 3 independent experiments.

Supplementary figure 7: Increase in Treg frequency is not due to preferential proliferation of FoxP3+ cells. (a) Experimental design for Fig 5e. (b) Experimental design for Fig 5f. (c) Purified CD4+CD25- T cells were labelled with CFSE and added to the upper chamber of transwell for experiment described in Fig 5e. On day 5, cell proliferation was assessed by measuring CFSE intensity by flow cytometry. To exclude possibility that increase in Tregs was not due to preferential survival of CD4+CD25+FoxP3+ cells viability (d) and absolute cell numbers (e) were assessed by trypan blue counts.

Supplementary Figure 8: Treg induction by pDCs is IDO and GCN2 dependant. (a) Monocytes from Healthy donors were isolated and in vitro differentiated into pDCs or

mDCs. Cells were then exposed or not to CTLA-4-Ig for 2 days and co-cultured with CFSE labelled CD4+CD25- T cells for 5 days in the presence or absence of IDO inhibitor 1-MT. Proliferation of CD4+FoxP3+ and CD4+FoxP3- T cells was assessed by flow cytometry. (b) Monocytes-derived pDCs or mDCs were exposed or not to CTLA-4-Ig for 2 days followed by co-culture with CD4+CD25- T cells for 5 days in the presence or absence of 1-MT and the frequency of IL-10, INF- γ and IL-17 expressing CD4+ T cells was assessed by flow cytometry. (c) Monocytes-derived pDCs or mDCs were stimulated or not with CTLA-4-Ig for 2 days and co-cultured for 5 days with CD4+CD25- T cells that were transfected with scrambled or GCN2 specific siRNA (prior to culture). FoxP3 expression in CD4+CD25- T cells was measured by flow cytometry. (d) IL-10, IL-17 and INF- γ expression was also assessed by flow cytometry.

Supplementary figure 9: FoxP3 conversion by photodepleted cells involved tryptophan depletion. (a) Supernatants of select cultures described in figure 6f were used for culturing freshly isolated CD4+CD25- T cells in the presence or absence of supplementary tryptophan and the frequency of FoxP3 expressing T cells was evaluated by flow cytometry. (b) Photodepleted cells were co-cultured with increasing number of monocyte-derived pDCs in the bottom chamber of transwell plate, whereas freshly isolated CD4+CD25- cells were placed in the upper chamber and cultured for 5 days. The frequency of FoxP3 expressing T cells was evaluated in the CD4+CD25- subset by flow cytometry.

Online supplementary material and methods

Patients and healthy donors

Peripheral blood samples were obtained from healthy donors and chronic GVHD (cGVHD) patients who failed to respond to at least 2 different immunosuppressive agents. All patient subjects underwent allogeneic stem cell transplantation at Maisonneuve-Rosemont hospital (HMR), Vancouver General Hospital, Ottawa Hospital or Hamilton Hospital, and all suffered from chronic GVHD according to the national institute of Health (NIH) Consensus Development Project criteria⁵⁰².

TH9402-induced photodepletion

Patients treated under the clinical Phase I/II study of ECP underwent 7 weekly leukapheresis followed by ex vivo photodepletion using the TH9402 treatment protocol¹², except that heat inactivated fetal bovine serum (FBS) was replaced by autologous serum for culturing photodepleted cells, and 1×10^8 photodepleted cells were re-infused into the patients on the same day. For in vitro studies, Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from cGVHD patients were isolated using density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Montreal, QC, Can) and resuspended at 1×10^6 cells/mL in X-Vivo 15 medium without phenol red (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented with 2.5% iFBS (Hyclone, Logan, UT, USA). Cells were incubated for 45 minutes in the presence of $1.32 \mu\text{M}$ 4,5-dibromorhodamine (TH9402; Kiadis Pharma, Amsterdam, Netherlands) at 37°C , 5% CO_2 in T75 flasks (VWR, Ville Mont-Royal, QC, Can) followed by exposure to 5 J/cm^2 visible light (514 nm) delivered by a scanning device (Kiadis Pharma).

Anti-viral T cell response

PBMCs were adjusted to 10^6 cells/ml and co-stimulatory antibodies (CD28 and CD49d, $1 \mu\text{g/ml}$, BD Biosciences) and brefeldin-A ($10 \mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich) were added. The cells were loaded with CEF32 peptide pool consisting of peptides derived from cytomegalovirus, Epstein-Barr virus (EBV) and influenza viruses (CEF). An un-stimulated culture and PMA/ionomycin-stimulated controls were included in each assay. Cells were incubated for

5 hours at 37°C followed by fixation/permeabilization, and staining for IFN- γ , CD3, CD4, CD8 and CD69.

Evaluation of Treg function

TH9402 photodepleted PBMCs from cGVHD patients were used as effector (E) cells, while untreated cells from the same GVHD patients were used as targets (T). Alternately, PBMCs isolated from healthy donors and activated by MHC mismatched irradiated PBMCs (6000 cGy; Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion, Ottawa, On, Can)⁴³⁴ were used as targets. To measure Treg function, effector cells were incubated with target cells at various E:T ratios in round bottom 96-well plates (Corning, Nepean, ON, Can.) for 5 days. Culture medium consisted of RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 1mM sodium pyruvate, non essential amino acids, 2 μ M L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (all Gibco, Burlington, ON, Canada), 50 μ M β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 50 IU/mL IL-2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). This media was used for all cell cultures unless described otherwise.

To measure cell proliferation, 1 μ C/well ³H-thymidine (0.037mBq; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA, USA) or 10 μ M 5-ethynyl-2'-deoxyuridine/well (EdU) (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) was added to 4 day cell culture and incubated further for 18 hours. Cells were then harvested using a Packard Filtermate Cell Harvester-Unifilter 96 unit (Packard, Groton, CT, USA) onto Unifilter plates (Millipore, Nepean, ON, Can) and ³H-thymidine incorporation was measured using a Topcount NXT Microplate Scintillation and Luminescence counter (Packard). In some experiments, cell proliferation was measured by determining incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; 10 μ M per well for 18 hr; Invitrogen, Burlington, ON, Canada). EdU incorporation was evaluated by flow cytometry (FACS LRS II, BD Bioscience) using Pacific blue conjugated azide (Invitrogen) and analyzed.

Transwell assay

Untreated PBMCs, photodepleted PBMCs or co-culture of untreated and photodepleted PBMCs isolated from cGVHD patients or isolated Tregs were cultured in the lower chamber of a 24-well transwell plate (0,4 μ m membrane separating upper and lower

chamber; Corning) in the presence or absence of inhibitors of IDO induction/activity. Purified CD4+CD25- T cells were cultured in the upper chamber of the transwell. The frequency of FoxP3 expressing cells in the upper chamber was evaluated after 5 day culture.

For testing activity of IDO secreted in culture supernatant following photodepletion of PBMCs, 5 day culture supernatants were concentrated using 30kd cutoff Amicon Ultra-15 centrifuge filter units. The concentrated supernatant was added to CD4+CD25- T cell culture to test its ability to generate FoxP3+ Tregs.

Real time quantitative-PCR (Q-PCR)

RNA was extracted from cultured cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA was synthesized (Biorad). IDO and GCN2 expression was determined by Q-PCR (ABI 7500 instrument) and results were normalized to B2M expression by Δ Ct method. Following primers were used for Q-PCR. *IDO*: forward 5'AGAGTCAAATCCCTCAGTCC3', reverse 5'AAATCAGTGCCTCCAGTTCC3'; *GCN2* forward 5'TGCAACACACCTGACCAC3', reverse 5'ACTTGCGCGGCCTGAACAA3'; *B2M* forward 5'-CACGTCATCCAGAGAATGG-3', reverse 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCGATCC-3'.

siRNA

siRNA directed toward IDO and GCN2, and associated reagents were purchased from Santa Cruz biotechnologies. Manufacturer's protocol was followed for siRNA transfection.

Protein analysis

Cells were lysed in buffer containing 50mM Tris-HCl pH 7.3, 5mM EDTA, 50mM KCl, 0,1%NP-40, 1mM dithiotheitol and protease inhibitor cocktail (Sigma). Protein concentration was determined by Bradford assay and Western blotted for IDO and β -actin. IDO and β -actin specific band signals were quantified using a LAS-3000:LCD camera coupled with MultiGauge software (Fugi, Stamford, CT).

Immunofluorescence

For immunofluorescence studies 50,000 PBMCs photodepleted or not and cultured for 3 days were cytopun, fixed, permeabilized and stained for FoxP3 and IDO. Images were

acquired using Axovision LE microscope (Zeiss). Images were taken with $\times 20$ or $\times 63$ oil-immersion lens. Images were cropped, brightness and contrast were enhanced minimally, and a 1-pixel median average was applied to each channel.

Antibodies and flow cytometry analysis

The following antibodies and reagents were purchased from BD Biosciences: APC-conjugated anti-CD123, -CD11b, -CD25, -CD62L, Pacific blue conjugated anti-CD45RA, PE or V450-conjugated anti-CD4, V450 or PE-conjugated anti-IDO, FITC conjugated anti-CD80, PE-conjugated anti-IL-10, 7-amino actinomycin D (7-AAD), APC conjugated anti-IFN γ , PE-labelled anti-IL-10, and PE-labelled anti-IL-17. Rabbit anti-human IDO antibody was from Fisher. Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and APC conjugated anti-human IL-10 antibodies were from Ebioscience. FoxP3 and CTLA-4 antibodies were from Biolegend. For intracellular staining, fixation and permeabilization buffer was purchased from Ebioscience. Cells were stained in complete PBS/FBS in the presence of Fc blocking reagent (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) for 15 minutes in cold, washed two times, and suspended in PBS/FBS. At least 5×10^4 events were acquired using FACS LSRII (BD Bioscience) and analyzed using Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Biochemicals and chemicals

1-Methyl-d-tryptophan (1-MT), brefeldin, Flt3L, G-CSF, LPS were obtained from Sigma. IL-2, CTLA-4-Ig, TGF- β and anti-TGF- β were acquired from Biolegend. Recombinant human IDO was purchased from R&D systems. Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was acquired from Invitrogen.

Tregs and CD4⁺ T cell isolation

The CD4⁺CD25⁺ human regulatory T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) was used for isolating Tregs and CD4⁺ T cells. In brief, total CD4⁺ T cells were isolated by negative selection. This fraction was used for positive selecting CD25⁺ T cells using magnetic microbeads conjugated antibody and the MACS LS columns (Miltenyi Biotec), whereas negative fraction was used as for obtaining CD4⁺CD25⁻ T cells.

pDCs and mDCs generation

Monocytes were isolated from PBMCs obtained from healthy donors by plastic adherence in 6-well plate (BD bioscience). Cells were then cultured for 5 days in the presence of 100 ng/mL Flt3L (pDCs) or 50 ng/mL G-CSF and 50 ng/mL (mDCs). At the end of the culture, only cells in suspension were collected. pDCs maturation was induced by culturing in the presence of human CD40L expressing murine NIH/3T3 cell line (kind gift of Gordan Freeman, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA), whereas mDC maturation was induced by LPS (100ng/mL).

CFSE labelling

Purified cells were incubated in the presence of 5 μ M CFSE (Invitrogen) for 15 minutes in RPMI lacking serum. Cells were washed with PBS and used in transwell experiment. CFSE staining was measured by flow cytometry.

HPLC analysis

PBMCs from patients suffering from cGVHD, co-culture of photodepleted PBMCs and cGVHD patients PBMCs, isolated Tregs, monocyte-derived pDCs or co-culture of Tregs and monocyte-derived pDCs were cultured in complete RPMI-1640 without phenol red and 50 IU/mL IL-2 (R&D systems) for 5 days. Levels of tryptophan and kynurenine were determined using 150x1mm Q-TRAP 4000 HPLC column (Phenomenex)

Inhibition of Treg mediators

Biological activity of Treg mediators was inhibited using anti-CTLA-4 antibody or isotype matched control antibody (Sigma-Aldrich) in co-cultures. To ensure inhibition by the mAbs, we used 10-times higher concentration than the manufacturer recommended ND50 (neutralizing dose 50). 1-MT was used at 10 μ M (?? Check) concentration for co-culture conditions and was used at 2-3 fold higher concentration for testing IDO activity in culture supernatant. Tryptophan was added at __ concentration.

Statistical analysis

Statistical analysis of all data was done by GraphPad Prism software version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was determined by the Mann-Whitney or ANOVA tests.

Authorship

Contribution: J.P.B. and D.C.R. designed the research; J.P.B. and E.C. performed the research; M.P.G. and R.S.D. contributed data; J.P.B. and V.P.D. analyzed data; J.P.B., V.P.D. and D.C.R. wrote the paper; D.C.R. and V.P.D. edited the paper.

Conflict-of-interest disclosure: D.C.R. has received research grant support from Kiadis Pharma. The remaining authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Sakaguchi,S., Powrie,F., & Ransohoff,R.M. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat. Med.* **18**, 54-58 (2012).
2. Miura,Y. *et al.* Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* **104**, 2187-2193 (2004).
3. Matsuoka,K. *et al.* Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* **120**, 1479-1493 (2010).
4. Rieger,K. *et al.* Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* **107**, 1717-1723 (2006).
5. Zorn,E. *et al.* Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* **106**, 2903-2911 (2005).
6. Ukena,S.N. *et al.* Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25 (high)CD127 (low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol* **90**, 213-218 (2011).
7. Dander,E. *et al.* Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* **88**, 1261-1272 (2009).
8. Chen,X. *et al.* Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* **110**, 3804-3813 (2007).
9. Bremm,M. *et al.* Advanced flowcytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3(+)CD4(+)-ratio in severe GvHD or relapse. *J. Immunol. Methods* **373**, 36-44 (2011).
10. Guimond,M. *et al.* P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* **100**, 375-382 (2002).
11. Mielke,S. *et al.* Reconstitution of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) after CD25-depleted allotransplantation in elderly patients and association with acute graft-versus-host disease. *Blood* **110**, 1689-1697 (2007).

12. Bastien, J.P. *et al.* Photodepletion differentially affects CD4⁺ Tregs versus CD4⁺ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* **116**, 4859-4869 (2010).
13. Munn, D.H. *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* **114**, 280-290 (2004).
14. Yan, Y. *et al.* IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **185**, 5953-5961 (2010).
15. Sharma, M.D. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3⁺ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* **113**, 6102-6111 (2009).
16. Munn, D.H. *et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. **22**, 633-642 (2005).
17. Jaspersen, L.K. *et al.* Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* **114**, 5062-5070 (2009).
18. Lee, S.M. *et al.* Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol. Lett.* **132**, 53-60 (2010).
19. Reddy, P. *et al.* Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J. Clin. Invest* **118**, 2562-2573 (2008).
20. Rosenblatt, J. *et al.* Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplant.* **45**, 1463-1468 (2010).
21. Rajasekar, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 344-350 (2008).
22. Tsigotis, P. *et al.* Extracorporeal photopheresis in refractory chronic graft-versus-host disease: the influence on peripheral blood T cell subpopulations. A study by the Hellenic Association of Hematology. *Transfus. Apher. Sci.* **46**, 181-188 (2012).

23. Vercoulen, Y. *et al.* Application of cultured human regulatory T cells requires preclinical in vivo evaluation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 852-855 (2012).
24. Godin-Ethier, J., Hanafi, L.A., Duvignaud, J.B., Leclerc, D., & Lapointe, R. IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Mol. Immunol.* **49**, 253-259 (2011).
25. Ratajczak, P. *et al.* IDO in human gut graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18**, 150-155 (2012).
26. Miwa, N. *et al.* IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 865-870 (2005).
27. Mellor, A.L. *et al.* Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol.* **175**, 5601-5605 (2005).
28. Koyama, M. *et al.* Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat. Med.* **18**, 135-142 (2012).
29. Moseman, E.A. *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **173**, 4433-4442 (2004).
30. Muller, A.J. *et al.* Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 17073-17078 (2008).
31. Munn, D.H. Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity. *Front Biosci. (Elite. Ed)* **4**, 734-745 (2012).
32. Sato, N. *et al.* Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol. Rep.* (2012).
33. Balachandran, V.P. *et al.* Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat. Med.* **17**, 1094-1100 (2011).

34. Filipovich, A.H. *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 945-956 (2005).

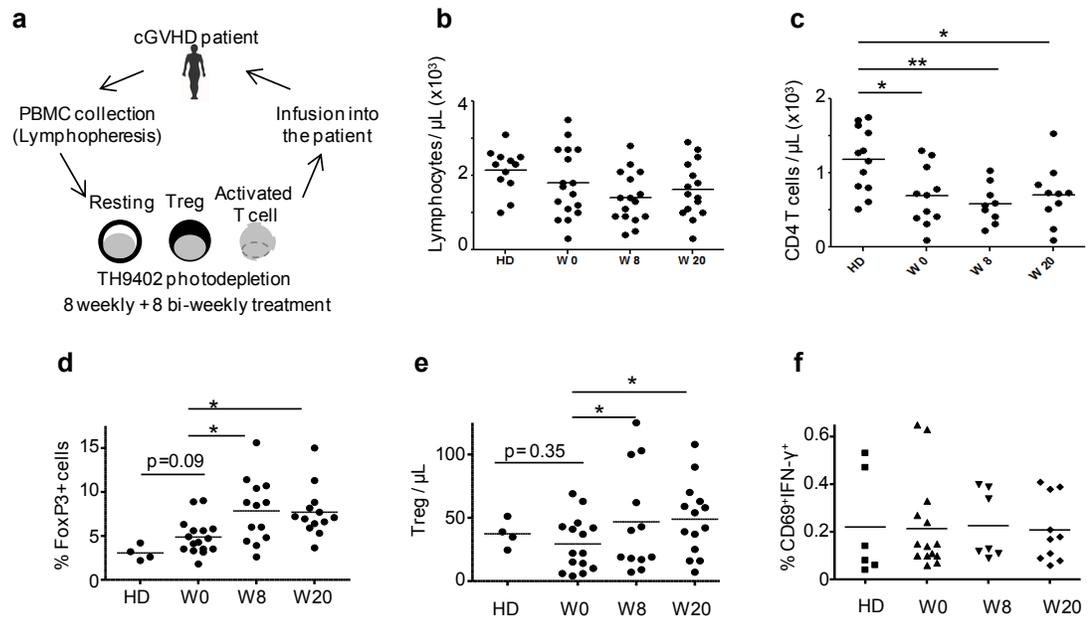


Figure 1

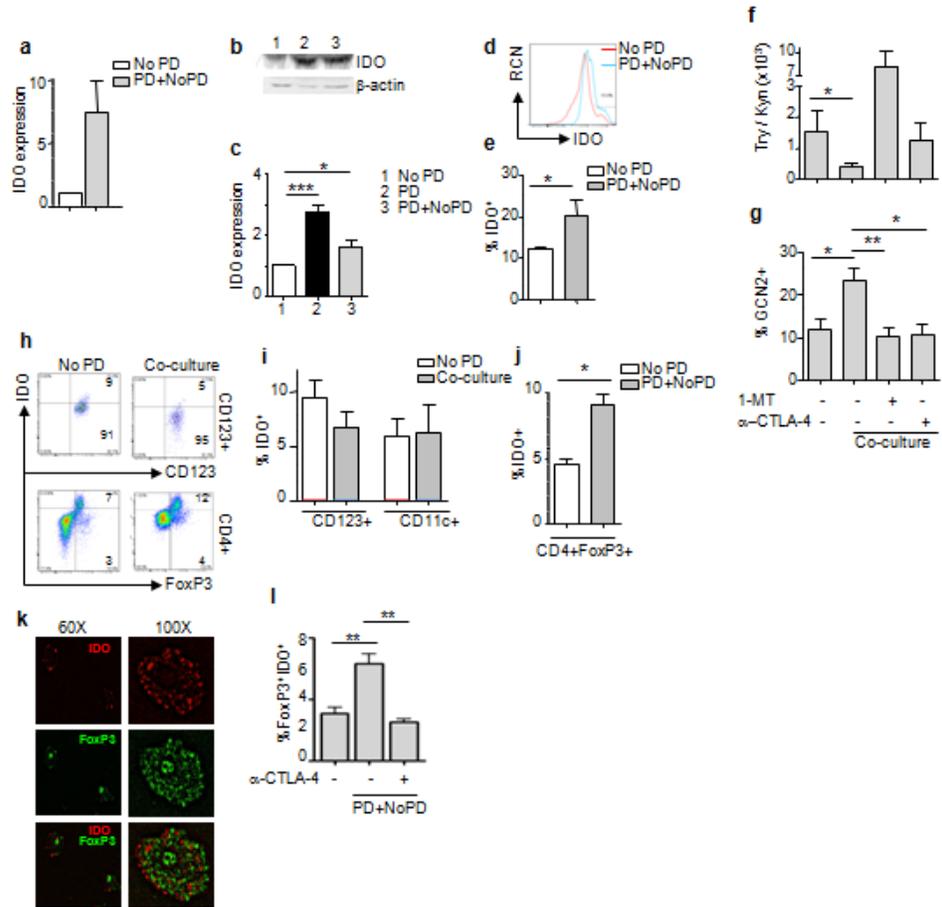
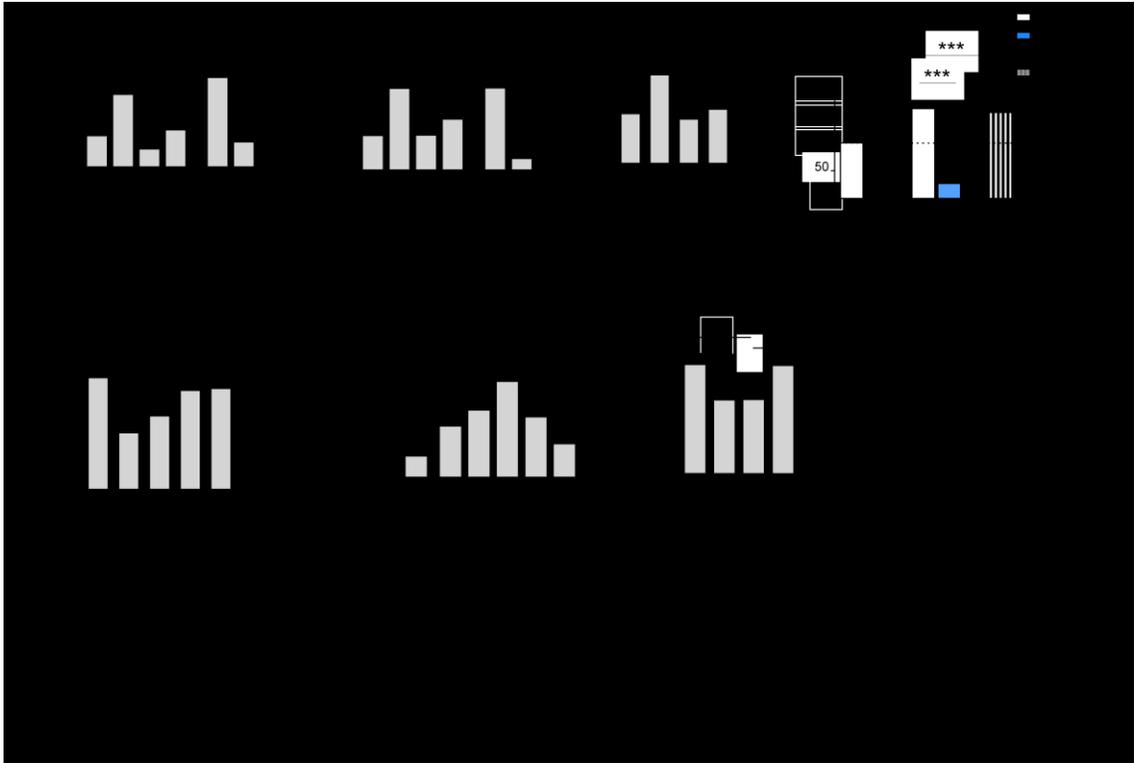


Figure 2



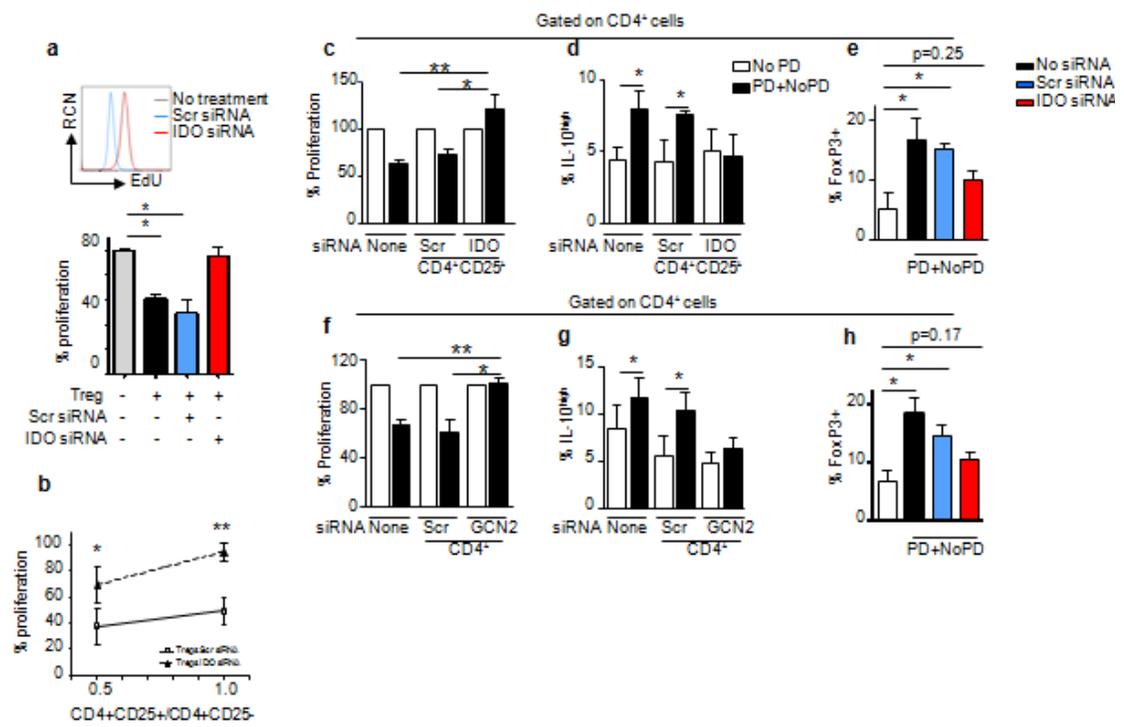


Figure 4

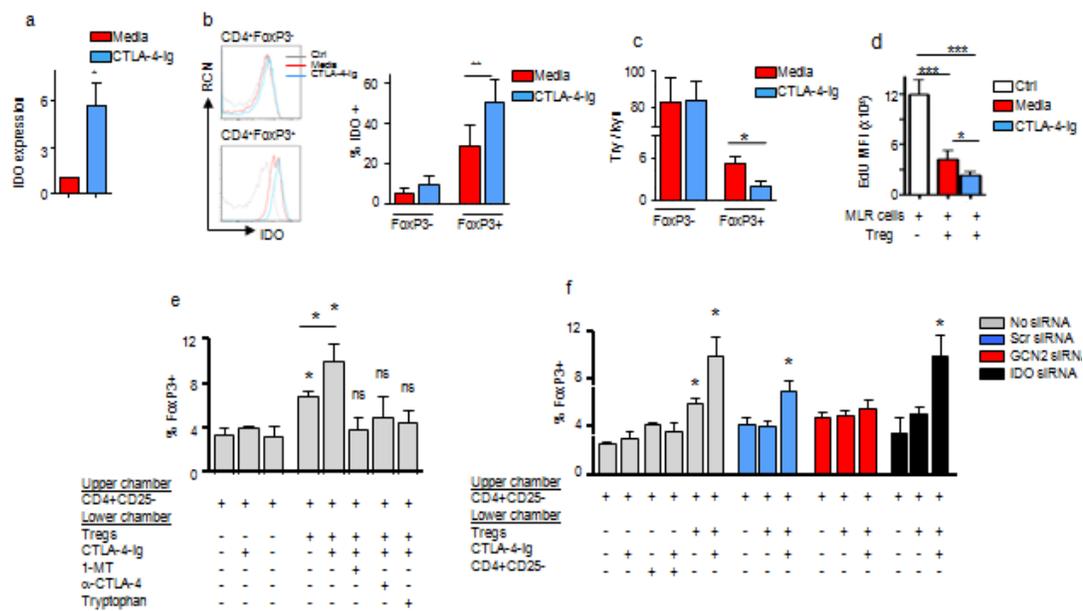


Figure 5

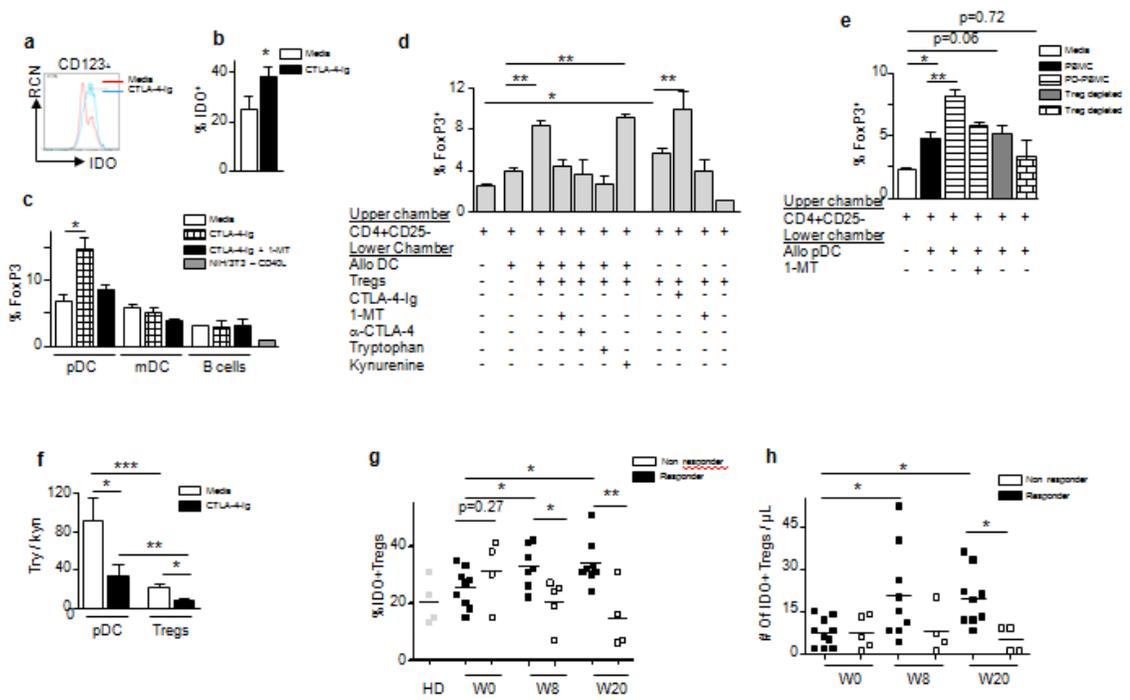


Figure 6

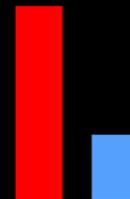
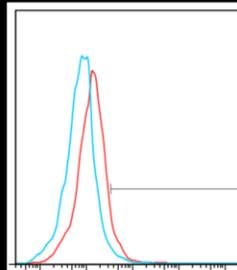
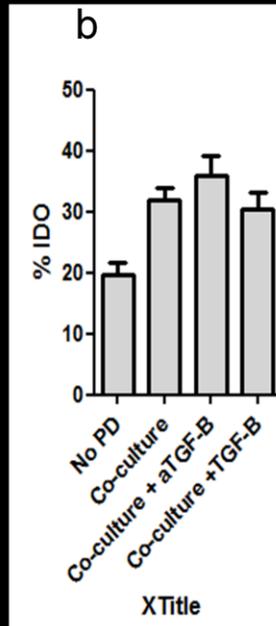
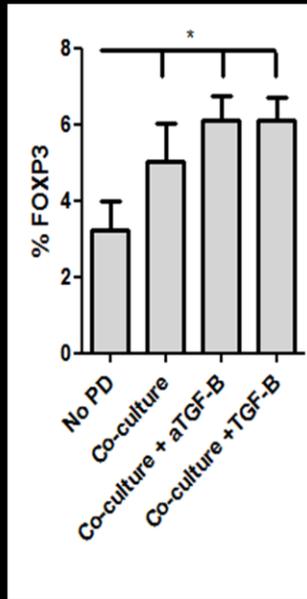




Figure S2

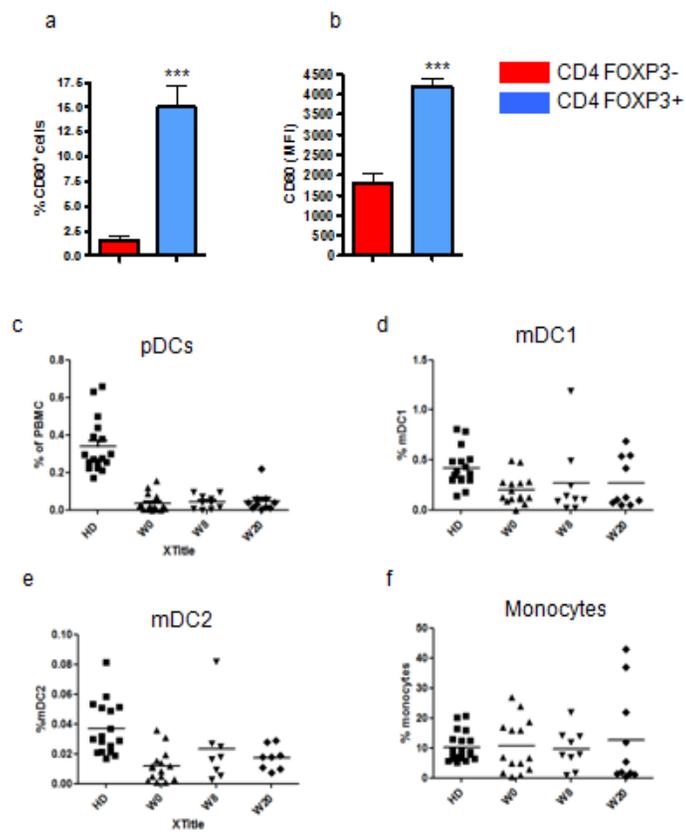


Figure S3

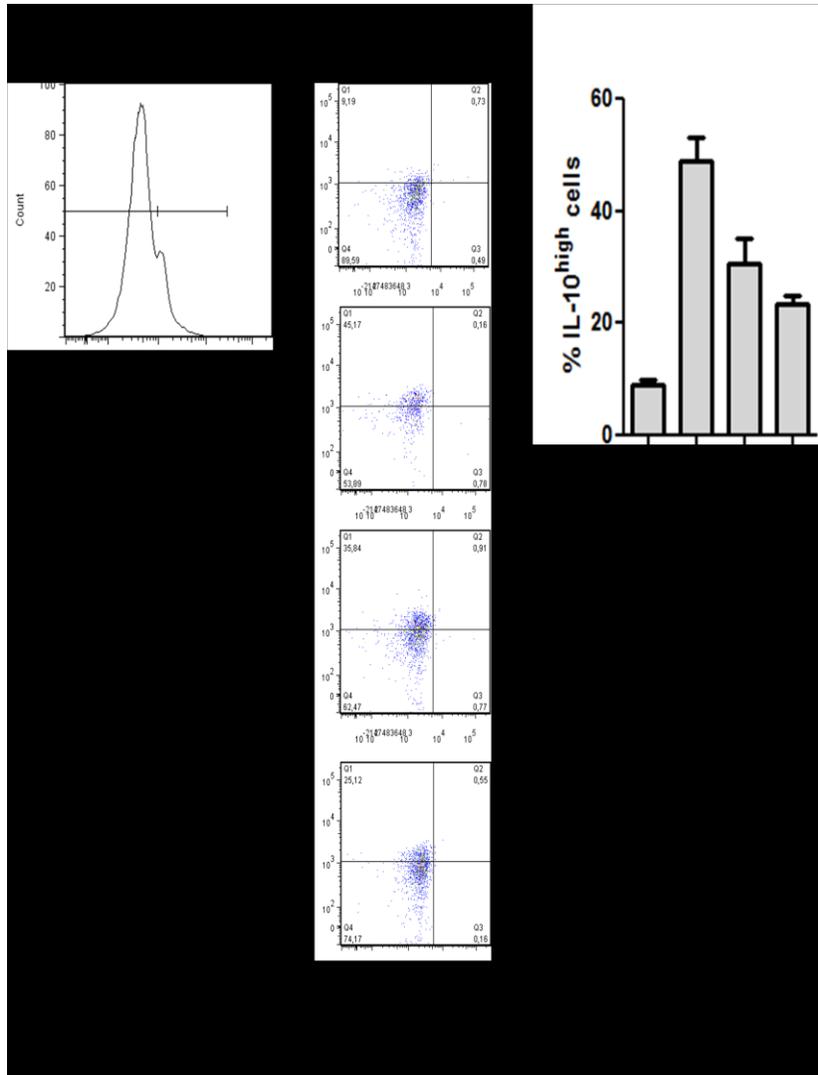


Figure S4

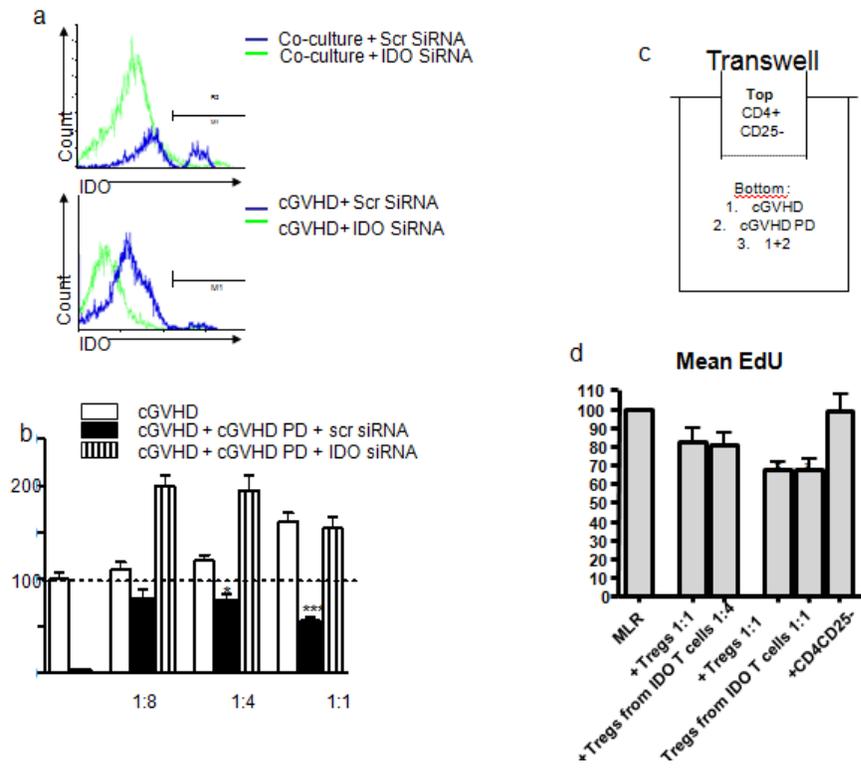


Figure S5

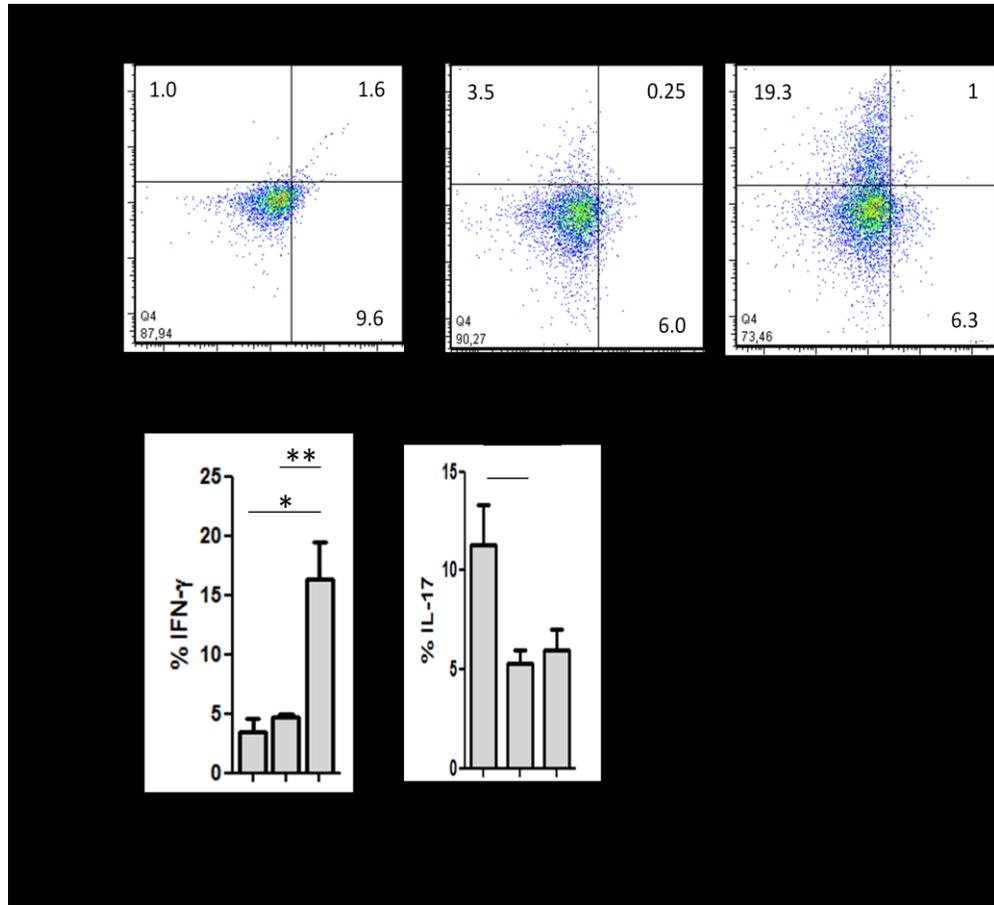


Figure S6

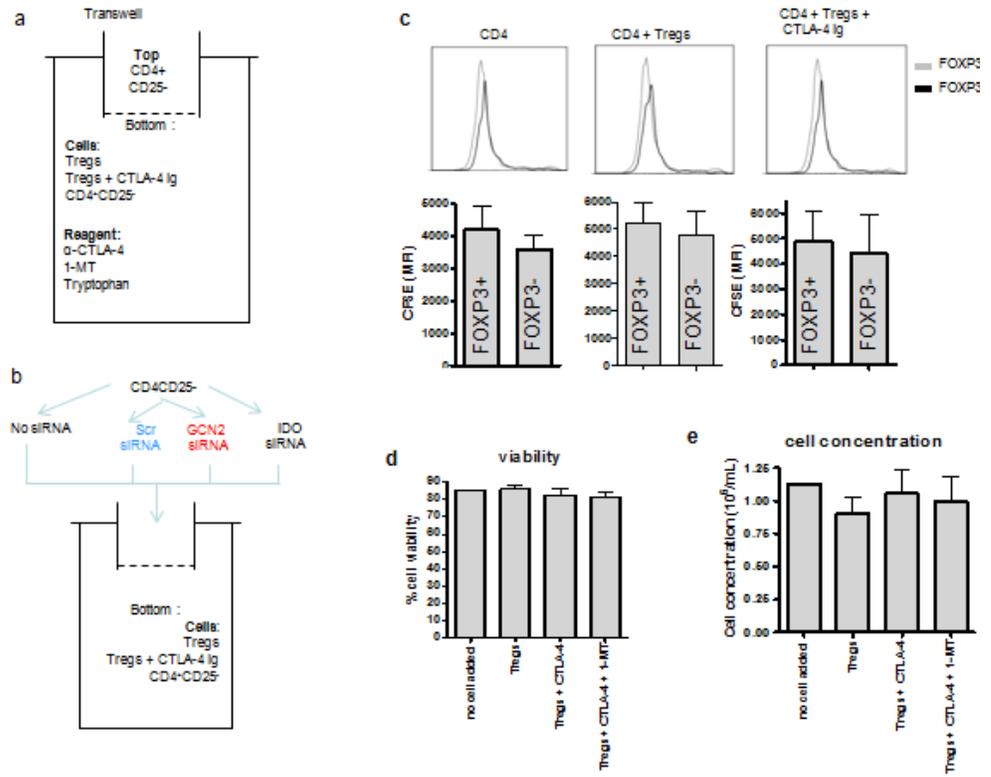


Figure S7

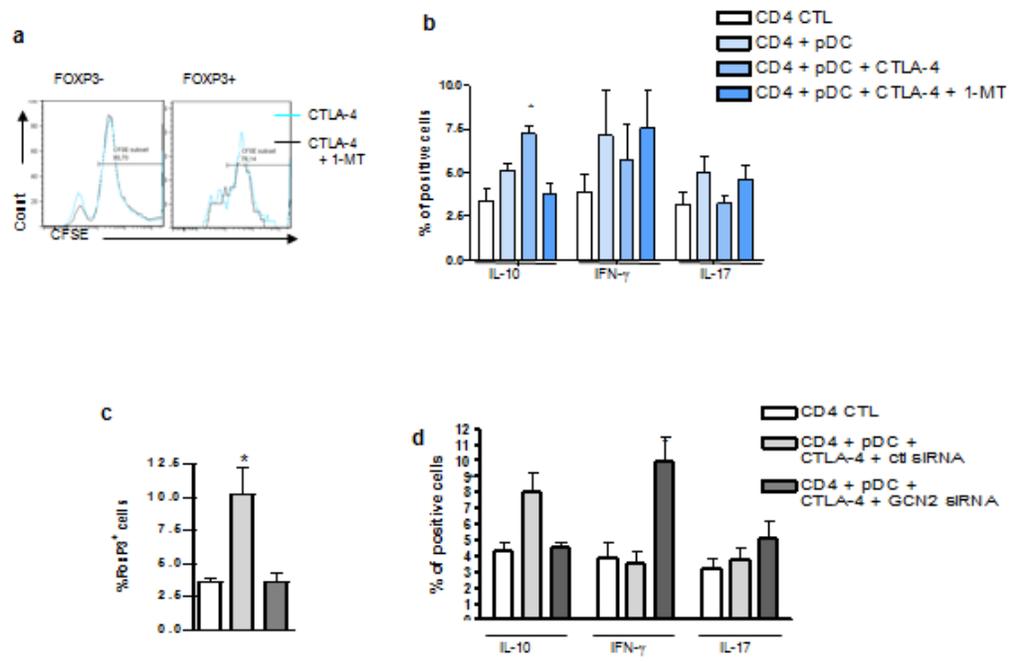


Figure S8

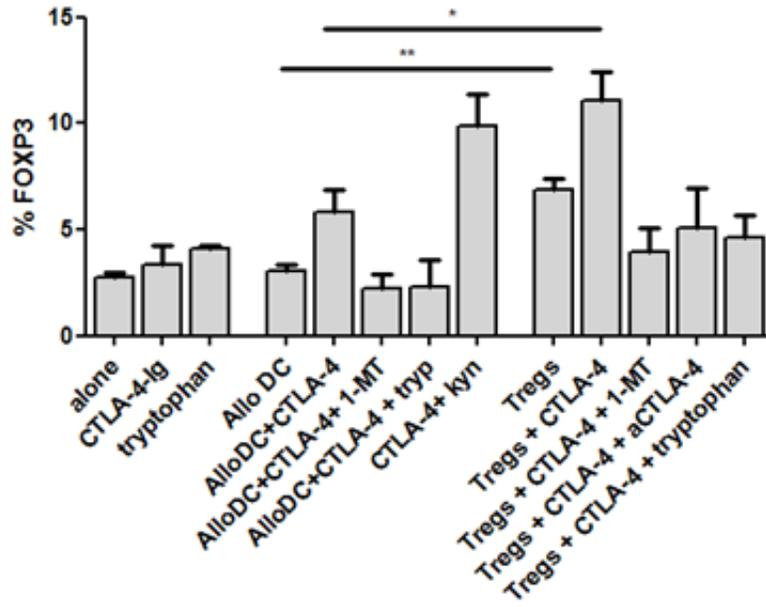


Figure S9

Chapitre 4.
Résultats Supplémentaires

Les résultats suivants ne font pas partie des articles des chapitres précédents. Toutefois, ils aident à la compréhension de ces derniers. De plus, ces résultats seront utilisés comme données de base pour les études ultérieures de notre laboratoire afin de mieux comprendre l'effet de la photodéplétion au TH9402 sur la réponse alloréactive.

1. La préservation des Tregs est nécessaire à la tolérance induite par la photodéplétion dans le contexte de la prévention de la GVHD.

Il a été démontré que, lors de transplantation de HSC haplo-compatibles, la photodéplétion au TH9402 permet de « nettoyer » le greffon de cellules T alloréactives. Ceci permet de promouvoir la reconstitution immune tout en la réduisant le risque associé au développement d'une GVHD. Chez l'homme, la photodéplétion permet d'infuser à des patients une dose de cellules T approximativement 100 fois plus élevée que le taux généralement défini comme capable de générer une GVHD mortelle. Toutefois, le mécanisme par lequel la photodéplétion permet cette tolérance demeure inconnu. Les deux hypothèses émises étaient soit que l'élimination des cellules alloréactives était suffisante pour générer cette tolérance ou que cette tolérance impliquait la préservation des Tregs.

Matériel et méthode

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle murin recevant des cellules T incompatibles photodéplétées ou non et déplétées en cellules CD4+CD25+ ou non afin d'éliminer les Tregs par billes magnétiques. Les cellules de souris C57BL/6 (Jackson Laboratories, Montréal, Canada) déplétées ou non en cellules CD4+D25+ ont été cultivées avec des cellules de souris BALB/c (Jackson) irradiées pendant 3 jours. Suite à cette

culture, les cellules ont subi ou non une photodéplétion au TH9402. La méthode de photodéplétion varie de celle observée dans les articles précédents. En effet, au lieu d'utiliser la technique de l'ECP, la technique ATIR a été utilisée. C'est-à-dire que les cellules ont été exposées 40 minutes à 10uM de TH9402 suivi d'une période d'extrusion de 50 minutes dans un milieu sans TH9402. L'exposition à la lumière fut de 5J/cm². Les souris BALB/c irradiées létalement (100Gy) ont reçu 1x10⁷ cellules de moelle osseuse déplétées en cellules T à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre Thy1.1 et du complément ainsi que 1x10⁶ cellules T provenant de souris C57BL/6.

Résultats

Les souris ayant reçu des cellules photodéplétées présentent une survie prolongée par rapport aux souris ayant reçu des cellules non traitées. Il n'y a pas de différence significative entre la survie des groupes ayant reçu des cellules T non traitées peu importe si le greffon était déplété ou non en Tregs. Toutefois, les souris ayant reçu des cellules photodéplétées où les Tregs avaient préalablement été éliminées présentent une survie diminuée par rapport au groupe dont les Tregs n'avaient pas été éliminées (p<0.05). Cette expérience nous amène donc à conclure que la préservation des Tregs joue un rôle important dans la tolérance induite par les cellules ayant subi la photodéplétion.

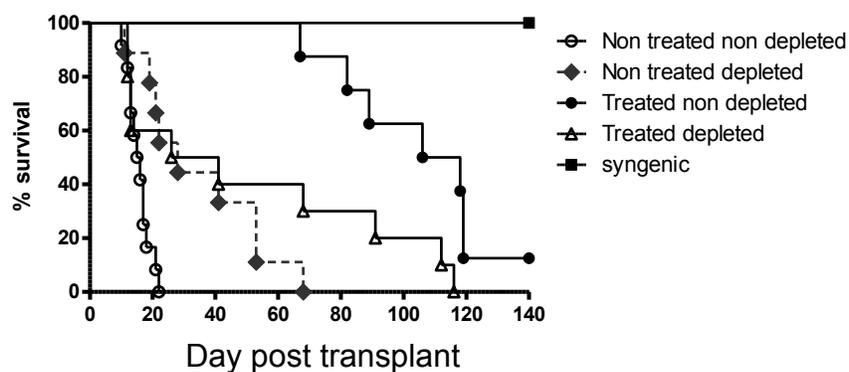


Figure 17 La préservation des Tregs est nécessaire à la tolérance induite par la photodéplétion dans le contexte de la prévention de la GVHD. Les souris Balb/c ont été

irradiées létalement et ont reçu une greffe d'HSC ainsi que des cellules T afin de déclencher une GVHD létale. Les cellules T injectées aux souris étaient traitées à la photodéplétion ou non et déplétées ou non en cellules CD4+CD25+.

2. La photodéplétion au TH9402 favorise la réponse Th2 au détriment de la réponse Th1 dans le contexte du traitement de la cGVHD.

Dans les deux articles précédents, nous avons démontré que la photodéplétion au TH9402 entraînait une augmentation des Tregs ainsi qu'une diminution de la réponse alloréactive de manière dépendante d'IDO. Toutefois, l'effet des cellules photodéplétées sur les cellules non Tregs n'a pas encore été évalué. Chez la souris, il a été démontré que l'aGVHD était médiée par les cellules CD4+ de type Th1 et les cellules CD8+ et que la cGVHD était médiée par les cellules T de type Th2³⁰⁹⁻³¹¹. Cependant, chez l'homme, il a été démontré que les cellules Th1 pouvaient également être en cause dans la pathophysiologie de la cGVHD³⁶⁹. Nous avons émis l'hypothèse que le développement préalable de l'aGVHD pouvait en être la cause. Le but de cette expérience est de comprendre l'effet des cellules photodéplétées et plus particulièrement des Tregs dans la balance Th1/Th2.

Matériel et Méthode

Des cellules de patients atteints de cGVHD ont été cultivées en présence de cellules traitées ou non à la photodéplétion pendant 5 jours. Ces cellules ont également été déplétées ou non en cellules CD4+CD25+ à l'aide de billes magnétiques. Après cette culture, les cellules T ont été restimulées à l'aide de PMA/Ionomycine (Sigma) pendant 4 heures. Du

brefeldine A (Sigma) a été ajouté durant les deux dernières heures pour bloquer la sécrétion de cytokines. Les taux d'IFN- γ et d'IL-4 ont été évalués par cytométrie en flux.

Résultats

Suite à une co-culture entre des cellules de patients cGVHD et des cellules traitées à la photodéplétion, les cellules T CD4⁺ expriment une quantité plus élevée d'IL-4 et une plus petite quantité d'IFN- γ . Ceci peut se traduire par une augmentation du phénotype Th2 et une diminution du phénotype Th1 dans ces cellules. Toutefois, la déplétion des cellules T CD4⁺CD25⁺ renverse cet effet. La déplétion des cellules CD4⁺CD25⁺ n'a toutefois pas d'effet significatif sur les populations Th1/Th2 dans les cellules non traitées. Ceci signifie que l'enrichissement en Tregs produit par la photodéplétion est nécessaire à l'effet des cellules photodéplétées sur le changement de la balance Th1/Th2 effectué par les cellules photodéplétées.

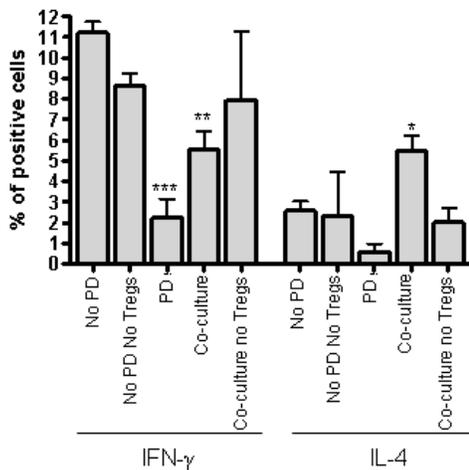


Figure 18 **Les cellules photodéplétées augmentent la réponse Th2 et diminuent la réponse Th1 de manière Treg dépendante.** Des cellules provenant de patients atteints de cGVHD ont été mises en culture avec des cellules photodéplétées ou non provenant du même patient pendant 5 jours. Les cellules photodéplétées étaient déplétées ou non en

cellules CD4+CD25+. Après restimulation, le taux de cellules exprimant IFN- γ et IL-4 a été évalué par cytométrie en flux.

3. Les cellules photodéplétées ont un effet inhibiteur sur les cellules CD8 de manière CTLA-4 et IDO dépendante.

Comme il a été décrit dans la revue de littérature, la réponse Th1 est associée à une réponse cellulaire médiée par les cellules T CD8. Puisque nous avons observé que les cellules photodéplétées entraînaient une baisse de la réponse Th1, nous avons tenté d'étudier l'impact de la photodéplétion sur la réponse cellulaire CD8. Ce tableau représente une compilation de 5 expériences indépendantes.

Dans le précédent article, nous avons identifié CTLA-4 et IDO comme étant les principaux effecteurs de l'effet anti-GVHD des cellules photodéplétées (Bastien et al, soumis). IDO exerce son effet anti-inflammatoire par déplétion du tryptophane. Cette diminution du tryptophane dans le milieu se traduit chez les cellules T par l'expression de GCN2, qui a pour effet d'arrêter le cycle cellulaire. Il existe deux destins possibles pour une cellule exprimant GCN2 : le premier consiste à, par un mécanisme inconnu, exprimer FOXP3 et de se convertir en Treg, le second se présente si la baisse du tryptophane est trop forte et que le stress au niveau du réticulum endoplasmique ne permet pas la survie de la cellule. Dans les cas de stress au niveau du réticulum endoplasmique, les cellules répondent en exprimant la protéine C/EBP homologous protein (CHOP), ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire et peut mener à l'apoptose⁵⁰³. Dans un premier temps, nous avons évalué la proportion de cellules exprimant CHOP dans les cellules T CD4 et CD8. Nous avons ensuite évalué l'impact des cellules photodéplétées sur l'activité cytotoxique des cellules T CD8 dirigées contre les cellules du patient de manière descriptive, par le marqueur de dégranulation des cellules CD8 (le CD107a)⁵⁰⁴, et fonctionnelle.

De plus, comme décrit dans la revue de littérature, il existe d'autres types de Tregs outre les cellules CD4+CD25+FOXP3+. Parmi ces cellules T régulatrices, on retrouve les cellules CD8+CD28- ainsi que les cellules T double négatives CD4-CD8-.

avons observé une préservation des Tregs exprimant CD4, la survie des autres types de cellules T régulatrices a également été investiguée.

Matériel et méthode

Évaluation de l'expression de CHOP et CD107a

Les co-cultures entre les cellules provenant de patients atteints de cGVHD et de cellules photodéplétées ont été effectuées suivant le modèle expliqué dans le second chapitre de cette thèse. L'évaluation de l'expression de CHOP et CD107a a été effectuée par cytométrie en flux.

Évaluation de l'activité cytotoxique des cellules CD8

Les PBMCs provenant d'un patient atteint de cGVHD ont été incubées pendant 4 heures avec du Cr⁵¹ (Amersham) pendant 90 minutes. Ces cellules ont ensuite été mises en culture pendant 4 heures en présence de cellules photodéplétées ou non provenant du même patient. Un anticorps neutralisant dirigé contre CTLA-4 a également été ajouté ou non à la co-culture. Le taux de Cr⁵¹ présent dans le surnageant a ensuite été évalué grâce à un compteur gamma.

Évaluation de la survie des cellules T régulatrices

Les PBMCs provenant d'un patient atteint de cGVHD ont été exposées ou non à la photodéplétion au TH9402. Trois jours après le traitement, la proportion de cellules T CD8+CD28- et de cellules T CD4-CD8- a été déterminée à partir des cellules survivantes (AnnV- et 7AAD-).

Résultats

Nous avons observé une augmentation de l'expression de la protéine CHOP chez les cellules T CD4+ et CD8+ suite au traitement à la photodéplétion. De manière intéressante,

l'inhibition d'IDO est associée à une perte de cette expression. Ces résultats suggèrent que l'activité d'IDO peut entraîner soit un arrêt du cycle cellulaire ou une augmentation de l'apoptose des cellules T suite au traitement à la photodéplétion. D'ailleurs, ceci corrèle avec les résultats obtenus démontrant une diminution de la prolifération dépendante de l'activité d'IDO des cellules T CD4 dans les co-cultures (Bastien et al, soumis). Toutefois, aucune différence n'a été observée au niveau de l'expression de CD107a, signifiant que l'état d'activation des cellules T CD8 n'a pas été changé par la photodéplétion.

Du point de vue fonctionnel, on observe également une activité cytotoxique réduite des cellules ayant subi la photodéplétion. Encore une fois, l'inhibition d'IDO entraîne une perte de cet effet. Ces résultats suggèrent fortement que la photodéplétion a un effet inhibiteur sur la réponse T CD8 de manière IDO dépendante. Ceci pourrait se traduire par le fait que l'activité d'IDO ne fait que diminuer la survie des cellules T CD8, sans changer leur activité.

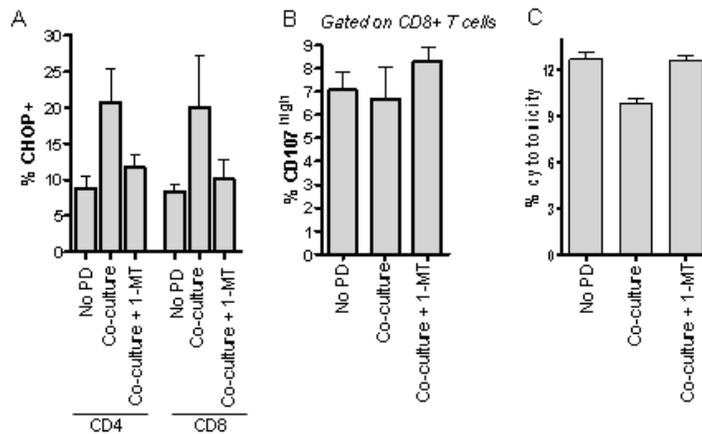


Figure 19 **La photodéplétion entraîne une baisse de l'activité des cellules T CD8 par augmentation de l'apoptose.** Des PBMC provenant de patients cGVHD ont été cultivés en présence de cellules photodéplétées ou non provenant du même patient en présence ou absence de 1-MT. A. L'expression du facteur pro-apoptique CHOP a été évaluée par

cytométrie en flux. B. L'expression du marqueur de dégranulation des cellules T CD8, CD107a a été évalué par cytométrie en flux. C. Les PBMCs provenant d'un patient atteint de cGVHD ont été incubés avec du Cr⁵¹. L'activité cytotoxique des cellules photodéplétées a été évaluée par un essai de relâche de Cr⁵¹.

Nous avons ensuite évalué la survie des cellules T régulatrices autres que les CD4+CD25+FOXP3+. Dans cette étude, nous avons observé que la photodéplétion était associée à une augmentation de la proportion de cellules CD8+CD28- ainsi que de cellules T double négatives CD4-CD8-. Ces résultats démontrent que la photodéplétion peut être utilisée pour enrichir non seulement les Tregs conventionnels, mais également les autres types de cellules T régulatrices incluant les cellules T CD8+CD28- et les cellules T double négatives.

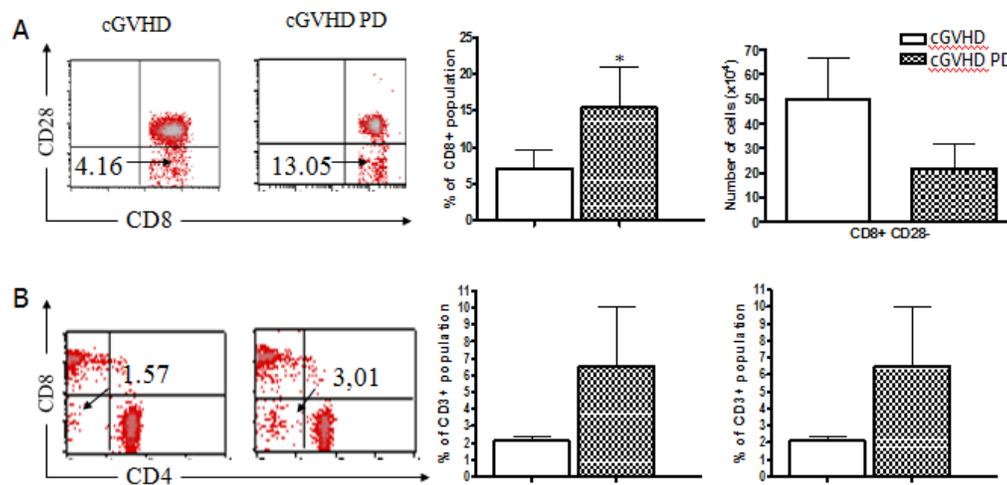


Figure 20 La photodéplétion permet l'enrichissement des cellules T régulatrices CD8+CD28- et cellules double négatives. Des PBMCs provenant de patients atteints de cGVHD ont été exposés à la photodéplétion. La proportion et le nombre absolu de cellules T régulatrices A. CD8+CD28- et B. CD4-CD8- survivant au traitement fut évaluée par cytométrie en flux.

4. L'activité de CTLA-4 induit une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation chez les APCs de manière indépendante de l'Activité catalytique d'IDO

Le 8-MOP, un agent photosensible fréquemment utilisé dans la thérapie de la cGVHD, induit la tolérance via son activité sur les cellules dendritiques. Il a été démontré que les cellules apoptotiques infusées au patient sont phagocytées par les monocytes et les cellules dendritiques immatures qui arborent alors un phénotype tolérogénique. Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à savoir si un tel mécanisme pouvait être présent chez les patients GVHD. Puisque nous avons démontré que CTLA-4 et IDO sont les principaux effecteurs tolérogéniques des cellules photodéplétées, nous avons cherché à connaître l'impact de la signalisation de CTLA-4 sur les monocytes et les cellules dendritiques.

Matériel et méthodes

Les monocytes des patients cGVHD ont été isolés par adhérence dans des plaques 6 puits adhérentes (BD Biosciences). Les cellules furent ensuite cultivées durant 6 jours en présence de 100ng/mL d'IL-4 (R&D system) et de G-CSF (R&D system). Les cellules en suspension furent collectées et cultivées pendant 3 jours en présence de LPS et de CTLA-4-Ig (R&D system). L'activité d'IDO a été bloquée ou non par l'ajout de 1-MT. Le phénotype des APCs fut analysé par cytométrie en flux.

Résultats

Les cellules présentatrices d'antigènes exposées au CTLA-4 présentent une diminution significative de l'expression des molécules de co-stimulation CD83 et CD86. Ceci est caractéristique des APCs immatures et tolérogéniques. De plus, une diminution

marquée de l'expression d'IL-12 est observée lorsque les cellules sont cultivées en présence de CTLA-4-Ig. De manière intéressante, ce phénomène n'est pas renversé par l'inhibition de l'activité catalytique d'IDO, ce qui suggère qu'il s'agit d'un phénomène IDO-indépendant. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si ce phénomène, causé par le CTLA-4-Ig, est également retrouvé dans le contexte de la photodéplétion au TH9402.

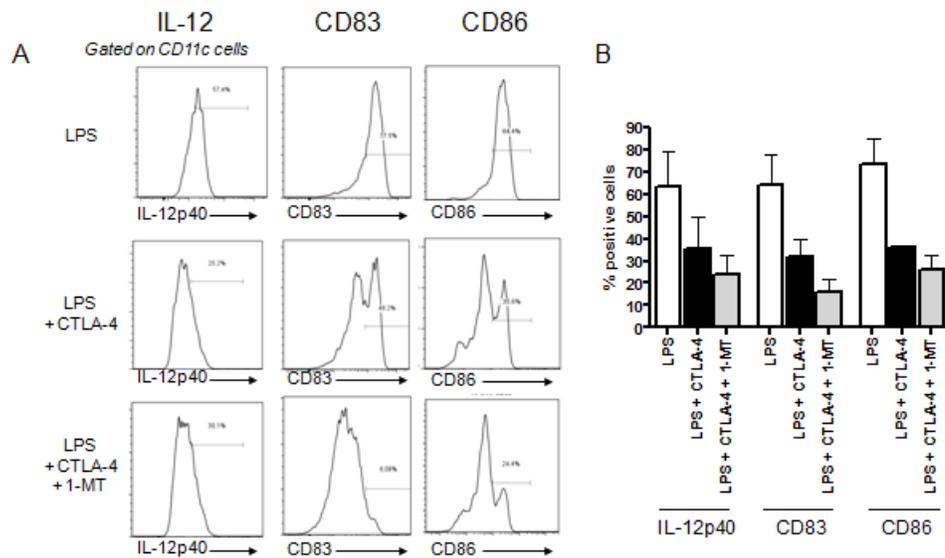


Figure 21 L'activité de CTLA-4 induit un phénotype tolérogénique chez les APCs. Les APCs d'un patient cGVHD ont été induits à partir de ses propres monocytes. Les APCs ont ensuite été exposées au LPS pour favoriser la maturation de ces derniers. Les cellules ont également été exposées au CTLA-4-Ig et au 1-MT. L'expression d'IL-12 ainsi que des molécules de co-stimulation CD83 et CD86 a été évaluée par cytométrie en flux. Est présenté en A. un exemple représentatif et B. une compilation de 4 expériences indépendantes.

5. Les patients atteints de cGVHD *de novo* possèdent un plus grand nombre de Tregs

La physiopathologie de la cGVHD demeure inconnue. Lors de la revue de littérature, nous avons émis l'hypothèse que les patients ayant préalablement eu une aGVHD ont une physiopathologie différente de ceux n'ayant jamais eu cette maladie. Dans ce sens, le taux de Tregs chez les patients atteints de cGVHD demeure sujet à controverse, puisque plusieurs affirment que ce taux est augmenté chez les patients souffrant de cGVHD alors que d'autres observent une diminution de ce taux. Dans cette étude nous avons évalué le taux de Tregs chez les patients participant à l'étude clinique portant sur le traitement de la cGVHD par la photodéplétion au TH9402.

Matériel et méthode

L'analyse phénotypique des cellules T des patients participant à l'étude clinique portant sur le traitement de la cGVHD par la photodéplétion au TH9402 a été effectuée par cytométrie en flux.

Résultat

Dans cette étude, nous avons observé que les patients souffrant de cGVHD *de novo*, c'est-à-dire n'ayant pas eu d'aGVHD au préalable, possédaient un taux de Tregs plus élevé que les patients ayant eu l'aGVHD au préalable. Ces résultats vont dans le même sens que l'hypothèse émise par Matsuoka et al stipulant que le taux de Tregs chez les patients souffrant de cGVHD est plus élevé que la normale alors que les patients souffrant d'aGVHD ont un défaut de reconstitution des Tregs suite à la greffe de cellules souches³³⁰. Il sera intéressant d'étudier avec plus de précision les différences entre les types de cGVHD au niveau des autres populations de cellules T.

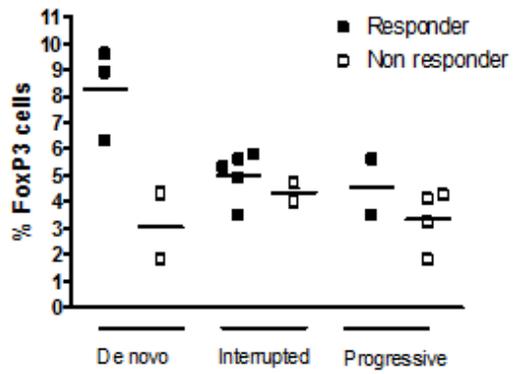


Figure 22 Les patients souffrant de cGVHD *de novo* ont une augmentation des Tregs comparé aux patients ayant préalablement eu l'aGVHD. Le taux de Tregs des patients souffrant de cGVHD réfractaire a été relevé en fonction du type de cGVHD du patient. Le taux de Tregs a été déterminé par cytométrie en flux.

Autres contributions

1. Jean-Philippe Bastien, Jean Roy, Denis-Claude Roy
Selective T cell depletion for Haplotype mismatched allogeneic stem cell transplantation
Semin Oncol. 2012 Dec;39(6):674-82
2. Michel Aubé, Nancy Dallaire, Jean-Philippe Bastien, Gorazd Krosl, Claude Perreault, and Denis Claude Roy.
SPECIFICS OF THE REDOX STATE OF B-CELLS AND THEIR SELECTIVE ERADICATION BY PHOTODEPOLETION
Manuscrit en préparation
3. Radia Sidi Boumédine, Jean-Philippe Bastien, Gorazd Krosl, Claude Perreault, Vibhuti Dave, Denis-Claude Roy
SPECIFIC ELIMINATION OF ALLOREACTIVE T LYMPHOCYTES USING TH9402-BASED PHOTODYNAMIC CELL THERAPY.
Manuscrit en préparation

Chapitre 5

Discussion

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons démontré que la photodéplétion au TH9402 permet une élimination sélective des cellules T activées tout en épargnant les cellules T au repos et les Tregs. Les Tregs préservés sont fonctionnels et peuvent ainsi immédiatement exercer un effet anti-GVHD caractérisé par une diminution de la prolifération des cellules alloréactives. Nous avons également observé que l'ajout de cellules photodéplétées aux cellules de patients souffrant de cGVHD était associé à une augmentation de la sécrétion d'IL-10. De plus, ces effets anti-inflammatoires sont conservés à de faibles ratios de cellules photodéplétées : cellules cGVHD, allant d'un ratio 1 :1 à un ratio 1 :8. L'importance de ce ratio est importante au plan clinique, puisque la quantité maximale de sang récupérer pour un traitement d'ECP est de 15% de la population lymphocytaire d'un individu donné⁵⁰⁵. Ceci impliquerait que les cellules Tregs infusées se retrouvent à un ratio compatible avec une activité immunorégulatrice.

De plus, nous avons démontré que les Tregs traitées au TH9402 pouvaient induire un phénotype Treg dans les cellules CD4+CD25-. Le mécanisme par lequel les Tregs photodéplétés pouvaient induire ce phénotype n'a pas été étudié dans ce chapitre. Cependant, cette induction de Tregs ainsi que l'effet anti-cGVHD des cellules photodéplétées étaient dépendants de CTLA-4, un des principaux effecteurs des Tregs. Nous avons ensuite démontré *in vivo* que l'injection de cellules photodéplétées chez le patient souffrant de cGVHD entraînait, chez ces patients, une augmentation de la proportion de Tregs aussi tôt que 4 semaines après le début du traitement. Ceci représente un intervalle beaucoup plus court que celui de 12 semaines rapporté avec le 8-MOP. Ces résultats semblent donc attribuer au TH9402 un profil d'activité favorable en regard du 8-MOP qui est l'agent présentement utilisé en clinique.

Alors que le TH9402 a déjà été utilisé avec succès dans la prévention de la GVHD dans le contexte des greffes de moelle osseuses haplo-identiques (Roy et al, manuscrit en préparation), les présents travaux représentent la première étude portant sur la capacité du TH9402 à traiter une cGVHD déjà établie. Les traitements actuels de la cGVHD impliquent

de hautes doses d'immunosuppresseurs présentant des effets secondaires débilissants. L'utilisation des propres cellules du patient afin de combattre la cGVHD représente une voie séduisante dans l'optique du développement de nouvelles thérapies immunosuppressives. De plus, cette thérapie étant effectuée *ex vivo*, les risques d'effets secondaires systémiques sont plus faibles pour le patient. Comme décrit dans la revue de la littérature, il existe deux manières efficaces de traiter la cGVHD : éliminer les cellules responsables de la cGVHD ou augmenter le nombre de Tregs possédant un effet anti cGVHD. La photodéplétion permet d'éliminer les cellules T alloréactives tout en préservant les Tregs. Son effet anti-cGVHD peut s'exercer ainsi dans ces deux registres. Toutefois, les thérapies immunosuppressives représentent une arme à double tranchant : en effet, une trop grande immunosuppression peut augmenter les risques d'épisodes infectieux ainsi que de rechutes. Afin d'optimiser les traitements dans le but d'éviter les risques de ces effets néfastes, une plus grande connaissance du mécanisme d'action des Tregs s'impose. Tel était l'objectif du second chapitre de cette thèse.

Dans le second chapitre nous avons démontré, dans un premier temps, que la photodéplétion entraînait une augmentation de la proportion de cellules T exprimant FOXP3 chez tous les patients traités à la photodéplétion au TH9402. Cependant, cette augmentation de proportion de Tregs pouvait se traduire par une augmentation du nombre de Tregs seulement chez les patients ayant répondu au traitement. Nous avons identifié IDO comme le principal effecteur de cette augmentation de la population Treg. De manière intéressante, nous avons observé que, contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature, ce sont les Tregs qui expriment IDO chez le patient atteint de cGVHD et que l'IDO exprimé par les Tregs contribue grandement à l'effet anti-GVHD et à l'induction du phénotype Tregs chez les cellules CD4+CD25-. Cette conversion implique une diminution du tryptophane ainsi que l'activité de la protéine GCN2. De plus, nous avons démontré que les Tregs d'un donneur sain pouvaient être modulés avec une forme soluble de CTLA-4 (CTLA-4-Ig) pour exprimer IDO et supprimer la réponse alloréactive de manière dépendante d'IDO et surtout d'induire un phénotype Treg dans les cellules CD4+CD25-.

L'inhibition de l'un des éléments de la cascade inhibitrice CTLA-4/IDO/diminution du tryptophane/GCN2 empêche cette conversion. Finalement, nous avons retrouvé les Tregs exprimant IDO *in vivo* chez le patient souffrant de cGVHD. Leur présence corrèle d'ailleurs avec l'amélioration de l'état du patient.

Les Tregs inhibent la réponse immunitaire par une variété de mécanismes dont les plus reconnus sont le TGF- β , IL-10 et CTLA-4. De manière intéressante, aucune augmentation du niveau de TGF- β n'a été observée et son inhibition n'entraîne pas une perte de l'effet anti-GVHD. Ceci peut être expliqué par le fait que plusieurs types cellulaires peuvent exprimer TGF- β . La sécrétion de TGF- β lors de la cGVHD est principalement associée à l'activité des cellules mononucléaires exprimant CD11b⁵⁰⁶. Lors de notre étude, la provenance du TGF- β n'a pas été évaluée. Il est possible que l'absence d'augmentation de TGF- β soit due à l'élimination des cellules produisant TGF- β lors de la photodéplétion. De plus, alors que le rôle inhibiteur de TGF- β a été observé dans plusieurs maladies auto-immunes, son rôle dans la cGVHD demeure controversé. En effet, Banovic et al ont démontré que TGF- β nuisait à la réaction GVL et qu'il augmentait la cGVHD chez la souris⁵⁰⁶. Une principale explication de ce phénomène pourrait être la présence d'IL-6 causée par la réaction GVH. En présence d'IL-6, TGF- β pourrait induire le développement des cellules TH17 au lieu des Tregs. De plus, tout au long de cette thèse, nous avons tenté d'influencer l'effet de TGF- β en ajoutant du TGF- β recombinant dans nos cultures ou en bloquant son activité à l'aide d'un anticorps monoclonal. Nous avons observé que cette voie n'affecte ni l'activité des Tregs, ni la production d'IDO dans les Tregs chez les patients souffrant de cGVHD. Ces résultats entraînent une question quant à la capacité des cellules T des patients atteints de cGVHD de répondre à TGF- β . La plupart des études portant sur l'effet de TGF- β sur les maladies auto-immunes sont effectuées chez la souris. Puisque les souris conservent leur activité thymique tout au long de leur vie, elles possèdent un pool de cellules T naïves qui seraient peut-être plus enclines à réagir au TGF-

β que les cellules d'un patient atteint de cGVHD possédant majoritairement des cellules T mémoires.

Parmi les molécules dont nous avons étudié, l'effet anti-prolifératif des cellules photodéplétées n'est dépendant que de CTLA-4 et IL-10. Ceci n'exclut pas la présence de deux types de cellules T régulatrices, soit les Tregs $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ pouvant inhiber la réponse immunitaire par CTLA-4 et les Tr1, qui n'expriment pas FOXP3, mais pouvant inhiber la réponse alloréactive par sécrétion d'IL-10. D'après les résultats obtenus dans le second chapitre de notre étude, l'augmentation d'IL-10 semble liée à l'activité de CTLA-4, puisque le blocage de l'activité de ce dernier ainsi que celle d'IDO entraîne une perte de l'augmentation de l'expression d'IL-10 par les cellules $CD4^+$. Dans le cas des cellules Tr1, il a été démontré que leur induction dépend de l'activité d'IL-10 et non d'IDO⁵⁰⁷. Ce résultat suggère que le type de cellule T régulatrice le plus impliqué dans l'effet que nous avons observé est les Tregs $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. Ceci n'exclut pas une participation, toutefois moindre, des cellules Tr1.

Comme décrit dans la section revue de littérature, une autre molécule faisant partie de la superfamille des immunoglobulines joue également un rôle dans le développement des Tregs : le CD28. Toutefois, ces deux molécules jouent un rôle opposé. CD28 favorisant l'activation des cellules T alors que CTLA-4 inhibe cette activation. Il est intéressant de constater que ces deux molécules peuvent induire le phénotype Treg par des mécanismes différents : CD28 agissant de manière intrinsèque à la cellule lors de son activation⁵⁰⁸ alors que CTLA-4 agit par l'entremise d'IDO à distance. De plus, l'activité de CD28 est associée à une prolifération préférentielle des Tregs comparé aux cellules T au repos⁵⁰⁹. Dans le second chapitre de cette thèse, nous avons démontré que les Tregs ne prolifèrent pas davantage que les cellules T conventionnelles. Ceci tend à éliminer la participation de CD28 dans l'augmentation observée du nombre de Tregs dans nos co-cultures. Toutefois, tout au long de cette thèse, nous n'avons pas vérifié explicitement le rôle joué par CD28 en bloquant son activité ou en ajoutant un agoniste. Il est possible que l'ajout ou le blocage de

CD28 puisse influencer nos résultats : L'action de CD28 pourrait dans un premier temps favoriser la prolifération des Tregs. Toutefois, dans le contexte de la cGVHD, la présence de cytokines inflammatoires dans le milieu pourraient favoriser le développement de cellules T inflammatoires. C'est à ce niveau que l'activité de CTLA-4 et d'IDO pourraient s'avérer importante afin d'inhiber ce développement. Donc, du point de vue du traitement de la cGVHD, la signalisation de CTLA-4 est préférable pour induire les Tregs, puisqu'il permet également d'inhiber l'activation des cellules T alloréactives alors qu'un mécanisme basé sur la signalisation de CD28 risquerait d'amplifier la réponse alloréactive. Il serait cependant intéressant d'investiguer de manière plus précise le rôle de CD28 dans l'effet anti GVHD des cellules traitées à la photodéplétion, car bien que nous ayons observé une baisse de cellules présentatrices d'antigène dans la circulation des patients atteints de cGVHD, il n'est pas certain que ces cellules soient absentes au niveau du tissu cible de la maladie. Dans un tel cas, la stimulation des cellules T et l'implication de CD28 pourrait jouer un rôle plus important dans cet effet.

Une question demeure sur le rôle réel joué par CTLA-4 dans l'activité anti-GVHD des Tregs. En effet, dans un premier temps, nous avons démontré que l'activité de CTLA-4 était associée à une augmentation d'IDO. Ce dernier menant à une induction du phénotype Treg dans les cellules CD4+CD25-. Ces résultats entraînent une question à savoir si CTLA-4 ne joue qu'un rôle dans l'induction des Tregs ou s'il joue à la fois un rôle anti-prolifératif et dans l'induction des Tregs? Ceci peut être répondu par l'augmentation de GCN2 dans les cellules T CD4+ qui est dépendante de l'action de CTLA-4. En effet, suite à une diminution du taux de tryptophane dans le milieu, également dépendante de l'action de CTLA-4, les cellules T sont privées de tryptophane. Ceci se traduit par une augmentation d'ARN de transfert (tARN) vides dans la cellule. Cette augmentation de tARN vides entraîne un stress au niveau du réticulum endoplasmique et amène l'expression de GCN2 dans la cellule. Il est reconnu que la première action de GCN2 est de bloquer le cycle cellulaire expliquant ainsi le rôle anti-prolifératif de CTLA-4 et IDO¹⁸⁷. Un blocage de l'expression de GCN2 a d'ailleurs résulté en la perte de l'effet anti-prolifératif des cellules traitées à la

photodéplétion. Par la suite, deux conséquences majeures sont possibles : la première est que le stress au niveau du réticulum endoplasmique ne soit pas trop fort. Dans un tel cas, les cellules T peuvent, par un mécanisme moléculaire encore inconnu, entraîner la conversion des cellules T en Tregs. La seconde est que le stress soit trop fort pour permettre à la cellule de survivre. La cellule exprimera alors la protéine pro-apoptotique CHOP (ou GADD-153) et la cellule entrera en apoptose¹⁷². Nous avons d'ailleurs observé une augmentation de l'expression de CHOP autant chez les cellules T CD4+ que CD8+ suite à une co-culture de cellules photodéplétées avec des cellules de patient cGVHD (Résultats supplémentaires). Ceci démontre qu'en plus d'induire un phénotype Treg chez les cellules T CD4+CD25-, les Tregs, via l'action de CTLA-4, puis d'IDO, peuvent induire l'apoptose chez les cellules T alloréactives. Cependant, nos résultats démontrent que l'action de CTLA-4 est médiée en grande partie par l'action d'IDO : le blocage de l'expression d'IDO dans les Tregs par un siRNA renverse complètement l'effet anti-prolifératif des cellules traitées à la photodéplétion. Si l'action de CTLA-4 était indépendante d'IDO, une telle expérience aurait résulté en une inhibition incomplète de l'effet anti-prolifératif des cellules traitées à la photodéplétion.

Nous avons également observé le rôle primordial joué par la déplétion du tryptophane dans le milieu. En effet, l'ajout de tryptophane dans le milieu est associé à l'abrogation de la génération de Tregs. De plus, l'inhibition de l'autre enzyme déplétive du tryptophane, le tryptophane hydroxylase avec le p-chlorophenylalamine (PCPA), a entraîné une perte de l'effet des cellules photodéplétées sur la génération des Tregs ainsi que sur l'augmentation de la production d'IL-10 dans les cellules CD4+. Par contre, cette inhibition n'a pas eu d'impact sur l'effet anti-prolifératif des cellules photodéplétées. Ceci peut être expliqué par le fait que l'activité du tryptophane hydroxylase résulte en la synthèse de sérotonine à partir du tryptophane. Ce neurotransmetteur possède un effet pro-inflammatoire sur les cellules T⁵¹⁰. La perte de ce signal pro-inflammatoire pourrait expliquer l'absence d'effet du PCPA sur la prolifération des cellules T.

Lors de cette thèse, nous avons également cherché à savoir quel type de cellules T étaient le plus susceptible à la conversion en Treg par IDO. Ceci représente une question importante, puisque chez les donneurs sains, l'induction d'un phénotype Treg par IDO a été rapportée principalement chez les cellules T naives (CD62L⁺CD45RA⁺). Les résultats de notre étude corroborent ces observations. Cependant, chez les patients plus âgés ayant une activité thymique diminuée ou ayant subi une greffe de moelle osseuse, la majorité des cellules T sont de type mémoire. Dans notre étude, nous avons démontré que, chez ces patients, les cellules T mémoires effectrices (TEM, CD45RO⁺, CD62L⁻) et, à un degré moindre, les cellules T mémoires centrales (TCM, CD45RO⁺, CD62L⁺) sont susceptibles à la conversion en Tregs sous l'action d'IDO. Les patients enrôlés dans notre étude clinique étaient tous des adultes, donc dans les conditions mentionnées ci haut et possédaient une grande proportion de cellules T mémoires. Ces résultats de cette étude clinique démontrent qu'il est possible de prendre avantage de l'activité d'IDO même chez des patients plus âgés avec une activité thymique réduite. Ceci signifie également que la photodéplétion au TH9402 et son mécanisme IDO dépendant pourrait être utilisés dans d'autres contextes incluant celui des maladies auto-immunes et de la GVHD aigue où les cellules T du patient ont majoritairement un phénotype mémoire.

Outre l'importance de l'activité d'IDO, un autre point relevé lors de cette thèse est la découverte de l'expression d'IDO par les Tregs. Jusqu'à tout récemment, l'expression d'IDO a été réservée aux cellules présentatrices d'antigènes, plus particulièrement les cellules dendritiques. Par contre, le groupe du Dr Lapointe a récemment observé IDO dans les cellules B⁵¹¹. Par contre, IDO n'était pas actif dans ces cellules. De plus, le groupe de Socié a observé l'expression de IDO dans un sous type de cellules T CD4 retrouvées au niveau intestinal chez des patients atteints de cGVHD⁴⁹⁷. La présence de ces cellules corrélait inversement avec la sévérité de la maladie⁴⁹⁷. Dans notre étude, il ne s'agit pas d'une incapacité des cellules dendritiques du patient d'exprimer IDO, mais bien d'une diminution prononcée du nombre de ces cellules chez le patient. Lorsque mis en présence de Tregs, nous avons observé une augmentation de la proportion d'APC exprimant IDO

corrélant avec la quantité de Tregs présentes dans la culture, ce qui démontre leur capacité à exprimer IDO. Toutefois, il s'agit de cellules dendritiques induites à partir de monocytes, il est possible qu'une expérience similaire sur des cellules dendritiques isolées de ces patients génère des conclusions différentes. Dans un tel cas, la capacité des cellules dendritiques d'exprimer IDO pourrait être utilisée comme un indicateur de GVHD. Par opposition, la proportion de Tregs exprimant IDO corrélait avec la réponse du patient au traitement. Il s'agit de la première étude à rapporter la présence d'IDO dans les Tregs fonctionnels chez les patients atteints de cGVHD. De plus, la baisse du ratio tryptophane :kynurenine dans le surnageant de nos cultures nous a permis de conclure qu'IDO était actif dans ces cellules. Nous avons démontré que l'IDO exprimé dans les Tregs était dépendant de CTLA-4, puisque le blocage de ce dernier est associé à une perte de la population de Tregs exprimant IDO. Le blocage de CTLA-4 résulte également en la perte de la diminution du ratio tryptophan :kynurenine et de l'expression de GCN2 dans nos co-cultures confirmant ainsi que l'activité d'IDO est bien dépendante de la liaison avec CTLA-4. L'autre molécule fréquemment utilisée afin d'induire IDO dans les cellules est IFN- γ . Dans notre étude, nous avons bloqué l'activité d'IFN- γ et avons observé un effet intermédiaire sur l'augmentation des Tregs dans nos co-cultures. Des études plus poussées seraient nécessaire afin de déterminer l'impact de cette cytokine sur l'induction d'IDO dans les Tregs de patients atteints de cGVHD. Toutefois, dans un contexte de cGVHD, l'utilisation de la voie du CTLA-4 est préférable, puisque l'IFN- γ est également associé à la réponse Th1 et un niveau d'inflammation plus élevé. Dans cette étude, nous avons également observé que l'IDO exprimé dans les Tregs contribue de façon importante à l'effet anti-prolifératif, à l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 par les cellules T CD4 ainsi qu'à la génération de Tregs par les cellules photodéplétées. Ceci souligne l'importance d'IDO non pas comme un mécanisme inhibiteur des cellules dendritiques causé par l'action des Tregs, mais comme mécanisme responsable de la potentialisation de l'activité suppressive des Tregs. Notre étude est d'ailleurs la première étude démontrant l'expression d'IDO biologiquement actif par les Tregs.

Les Tregs sont souvent présentés comme une source de CTLA-4 pour les cellules cibles, généralement les cellules dendritiques ou autre APC. Le CTLA-4 inhibe l'activation de la cellule T alors que l'expression d'IDO est associée à l'APC qui exprime son ligand : CD80 ou CD86. Par contre, CTLA-4 est présent sur une variété de cellules telles que les cellules T activées, ce qui signifie que ces cellules peuvent également être source de CTLA-4 et amener l'induction d'IDO. D'autres études seront nécessaires pour évaluer l'importance du CTLA-4 exprimé par les Tregs, tel qu'un blocage sélectif de l'expression de CTLA-4 par les Tregs. De plus, l'expression de CD80 par ces dernières suggère que les Tregs peuvent être à la fois une source et une cible pour CTLA-4. Toutefois, la nécessité du contact cellulaire pour l'effet anti-GVHD des cellules photodéplétées exclut la présence d'une forme sécrétoire de CTLA-4 provenant des Tregs. De plus, dans notre étude, nous avons observé qu'afin d'avoir un niveau de conversion de non Tregs en Treg optimum, la seule présence de cellules photodéplétées ne suffit pas : la présence de cellules de patients cGVHD non traitées est nécessaire. Il existe plusieurs explications possibles à ce phénomène : premièrement, il est possible que, puisque les cellules activées ne meurent pas immédiatement suite à la photodéplétion, cette mort retardée puisse entraîner une baisse dans la concentration cellulaire. Cette baisse dans la concentration cellulaire pourrait avoir comme effet de diminuer les contacts Treg – Treg, limitant l'expression d'IDO. De plus, dans cette optique, il est possible que la baisse de concentration cellulaire diminue l'impact d'IDO sur le ratio tryptophane :kynurenine. Ici, un ajustement de la concentration cellulaire permettrait de répondre à cette question. La deuxième explication est que le CTLA-4 ne provienne pas exclusivement des Tregs. Il est alors possible que les cellules activées retrouvées dans les cellules cGVHD non traitées fournissent au moins en partie le CTLA-4 requis pour induire IDO dans les Tregs. Il est également possible que les Tregs puissent interagir avec des APC pour augmenter l'expression d'IDO. Toutefois, cette explication semble peu probable puisque l'on observe ni une augmentation de l'expression d'IDO dans les cellules CD11c⁺, ni dans les cellules CD123⁺. Une autre explication est que les cellules T activées puissent également exprimer IDO. En effet, ces cellules expriment de manière transitoire plusieurs marqueurs communs

avec les Tregs tel FOXP3, CD25, CTLA-4 et CD80. Il n'est pas impossible que les cellules T activées puissent exprimerIDO également. Toutefois, les cellules T activées possèdent un métabolisme plus rapide que celui des Tregs. Ces cellules risqueraient alors de souffrir plus de manque de tryptophane dans le milieu et entrer plus rapidement en apoptose.

Les patients de la cohorte que nous avons étudiée possédaient un nombre réduit d'APC par rapport aux donneurs sains. Il est intéressant de noter qu'il existe une disparité entre les taux de cellules dendritiques rapportés dans la littérature. Il serait possible que ces résultats reflètent la différence au niveau de la physiopathologie de la cGVHD. En effet, la cGVHD peut être précédée ou non de l'aGVHD. L'aGVHD est caractérisé par une diminution des populations de cellules dendritiques et de Tregs. À l'opposé, des études portant sur la cGVHD ont démontré que la population de Tregs peut soit être augmentée ou diminuée dans cette maladie. Cependant, aucune étude n'a évalué l'impact de l'historique du patient sur les populations de Tregs et de cellules dendritiques. Nos résultats préliminaires suggèrent que les patients atteints de cGVHD de novo (n'ayant pas eu préalablement d'aGVHD) possèdent une population Treg en nombre plus élevé que les patients atteints de cGVHD de type « interrompue » (aGVHD guérie suivie de cGVHD) et type « progressive » (aGVHD évoluant en cGVHD). Toutefois, aucune corrélation n'a été établie entre le nombre de cellules dendritiques et le type de cGVHD. En raison de la taille de l'échantillon, des études plus approfondies doivent être effectuées afin de confirmer nos observations.

Dans les conditions dans lesquelles nos études se sont déroulées, nous avons découvert qu'en présence d'un nombre réduit d'APCs, les Tregs peuvent prendre la relève et exprimerIDO. De manière intéressante, la quantité d'IDO exprimée dans les Tregs est inversement proportionnelle à la quantité d'APC retrouvée dans la culture. C'est-à-dire que plus la quantité d'APC est importante dans la culture, moins les Tregs exprimentIDO. Par opposition, la quantité d'IDO exprimée par les APCs n'est pas influencée par le nombre de

Tregs retrouvés dans la culture. Toutefois, le ratio tryptophane : kynurenine corrélait avec l'IDO exprimé par les Tregs et non avec celui exprimé par les APCs. Toutefois, ces observations ont été effectuées à partir du sang des patients. Les cellules dendritiques dans les tissus pourraient être présentes en plus grand nombre et dans un état d'activation différent comparé à celles retrouvées dans le sang. Une étude va d'ailleurs dans ce sens⁵¹². Il est possible que les Tregs puissent interagir différemment avec les APCs au niveau des tissus et induire de cette manière IDO provoquant ainsi une tolérance à l'hôte. Cependant, cette même étude précise que les cellules dendritiques au niveau de la peau chez les patients atteints de cGVHD expriment un haut niveau de CD86 et un bas niveau de CD80⁵¹². Le CTLA-4 possédant une affinité beaucoup plus grande pour le CD80 que le CD86⁵¹³, il est possible que l'induction d'IDO soit moins efficace dans ces cellules. Bref, l'évaluation des cellules dendritiques au niveau des tissus demeure sous étudié et un approfondissement des connaissances demeure nécessaire afin d'évaluer le possible impact de l'interaction Treg – cellules dendritiques au niveau des tissus. Des études similaires pourraient être produites chez la souris afin d'évaluer le rôle des cellules dendritiques dans les tissus. Toutefois, il existe plusieurs différences physiologiques au niveau de la réponse T entre l'homme et la souris et plusieurs questions sont à répondre quant à la capacité de Tregs à exprimer IDO et leur interaction entre elles et avec les cellules dendritiques. Toutefois, le groupe du Dr. Socié a observé un sous-type de cellules T exprimant IDO au niveau du tissu intestinal⁴⁹⁷. Une étude plus approfondie de ces cellules serait importante à savoir si ces cellules sont bien des Tregs. Toutefois, nos résultats suggèrent que les Tregs exprimant IDO que nous avons observé dans nos co-cultures et dans le sang des patients atteints de cGVHD puissent être les mêmes que ces groupes ont observés au niveau des tissus.

Ces résultats ont amené une nouvelle question à savoir si l'expression d'IDO dans les Tregs était restreinte aux patients souffrant de cGVHD ou si elle pouvait être induite chez les donneurs sains. Nous avons démontré que, suite à la liaison avec CTLA-4-Ig, les Tregs peuvent augmenter leur expression d'IDO. De manière surprenante, 30-40% des

Tregs chez les donneurs sains expriment déjà IDO. La liaison avec CTLA-4 permet d'augmenter cette proportion. L'IDO exprimé par les Tregs de donneurs sains est actif, tel que confirmé par la chute du ratio tryptophane : kynurenine. Les Tregs sont également capables d'inhiber la prolifération des cellules T CD4 alloréactives de manière dépendante d'IDO. De plus, les Tregs peuvent induire un phénotype Treg dans les cellules T CD4+CD25-. Ce phénomène est augmenté par l'ajout de CTLA-4-Ig. L'action de CTLA-4 et d'IDO est primordiale pour cette conversion de non-Tregs en Tregs, puisque le blocage de CTLA-4, d'IDO ou l'ajout de tryptophane résulte en la perte de cette conversion. La nécessité de la chute du tryptophane a été confirmée par le blocage de GCN2 qui résulte en l'incapacité des cellules CD4+CD25- à se convertir en Tregs. Il est intéressant de noter que l'inhibition d'IDO dans les cellules CD4+CD25- ne résulte pas en la perte de la capacité de ces dernières à se convertir en Tregs. Ceci signifie que l'IDO doit provenir des Tregs sous l'action de CTLA-4-Ig et que ce dernier n'a aucun effet sur les cellules CD4+CD25-. Bref, nous avons démontré qu'IDO pouvait être utilisé par les Tregs afin de diminuer la réponse alloréactive, mais aussi que ce mécanisme pouvait être renversé par l'ajout de tryptophane. Ces résultats sont d'une grande importance, puisqu'ils démontrent que l'expression d'IDO par les Tregs n'est pas restreinte aux patients souffrant de cGVHD. Puisque les Tregs provenant de donneurs sains ont la capacité d'exprimer IDO, on devrait pouvoir retrouver des Tregs avec une capacité similaire chez les patients souffrant d'autres maladies telles les maladies auto-immunes. Ceci pourrait donc avoir des implications dans le traitement de telles maladies où IDO joue un rôle primordial.

Durant cette étude, nous avons pu apprécier l'action de CTLA-4 sur les Tregs. Cependant, CTLA-4 peut également agir sur d'autres types cellulaires. En effet, dans nos résultats supplémentaires, nous avons observé que CTLA-4 possède une action inhibitrice sur les macrophages et les cellules dendritiques pouvant être traduite par une diminution des molécules de co-stimulation ainsi que de la production d'IL-12 sur ces cellules. Cette réduction n'a toutefois pas été évaluée dans le contexte de la photodéplétion au TH9402. Toutefois, l'expression des molécules de costimulation n'a pas été évaluée dans les cellules

T provenant des patients cGVHD. De manière intéressante, le blocage d'IDO par 1-MT ne renverse pas cet effet, laissant présager que cet effet est indépendant d'IDO. Il est toutefois important de noter que la présence de 1-MT bloque l'activité catalytique d'IDO et non pas sa présence. Il est possible qu'IDO aie d'autres effets non médiés par son activité catalytique, vu sa capacité à agir comme un messager dans la signalisation de TGF- β ⁴⁸. Ceci pourrait impliquer deux mécanismes distincts d'induction de la tolérance par les cellules exposées à la photodéplétion au TH9402. Un premier, dépendant de CTLA-4 et de l'activité catalytique d'IDO et un autre dépendant de CTLA-4, mais indépendant de l'activité catalytique d'IDO. Afin d'évaluer si le second mécanisme est similaire à celui observé par Orabona et al⁴⁸, il serait alors nécessaire de bloquer l'activité de TGF- afin d'inhiber également la phosphorylation d'IDO.

Il est important de noter qu'IDO ne possède pas seulement des rôles bénéfiques. En effet, il a été démontré qu'IDO joue un rôle important dans l'évasion des tumeurs au système immunitaire (revue dans ¹⁷⁷). De plus, plusieurs groupes tentent d'utiliser l'inhibition d'IDO afin d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie des tumeurs dans les tumeurs exprimant IDO¹⁷⁷. D'autres stratégies consistent en l'inhibition des molécules effectrices des Tregs. Dans nos études, nous avons démontré que l'ajout de tryptophane dans le milieu permettait de surpasser l'effet anti-prolifératif ainsi que la conversion de T conventionnels en Tregs par IDO. L'inhibition des Tregs par l'utilisation de tryptophane par voie parentérale ou orale pourrait être envisagée afin d'augmenter l'efficacité de l'immunothérapie du cancer. Ceci pourrait entraîner une amélioration des traitements et de la qualité de vie des patients atteints de tumeurs infiltrées par une population de Tregs.

L'impact d'IDO sur la réponse immunitaire T CD4 dans le contexte de la cGVHD demeure à investiguer plus profondément. En effet, bien que nous ayons observé une diminution de la prolifération des cellules T alloréactives, une augmentation de sécrétion ainsi que de la proportion de cellules exprimant IL-10, l'ajout de cellules traitées à la photodéplétion n'a pas entraîné de changement au niveau de la sécrétion des cytokines pro-

inflammatoires IFN- γ et TNA- α . Il serait intéressant d'étudier le rôle d'IDO sur les réponses Th1 et Th2. Nos résultats préliminaires semblent démontrer que la photodéplétion entraîne une hausse de la réponse Th2 et une diminution de la réponse Th1 de manière dépendante à IDO (résultats supplémentaires). L'impact sur la réponse Th17 n'a toutefois pas été évalué. La réponse Th17 chez le patient cGVHD pourrait influencer la réponse au traitement. En effet, il a été décrit chez la souris que la présence d'IL-6 dans le milieu peut entraîner la dégradation d'IDO. Ainsi, dans un milieu favorisant la réponse Th17, il est possible que l'expression d'IDO soit inefficace. Il a également été démontré que les Tregs, en présence d'IL-6 pouvaient effectuer de la reprogrammation cellulaire. C'est-à-dire qu'elles peuvent sécréter des cytokines inflammatoires et arborer un phénotype « T helper-like » en présence de cytokines inflammatoires, principalement IL-6, le tout, sans jamais perdre l'expression de FOXP3⁵¹⁴. Dans cette même étude, les auteurs ont observé que l'IDO provenant de cellules dendritiques permettait de contrer cette reprogrammation cellulaire⁵¹⁴. Cette étude pourrait s'avérer très intéressante dans le contexte de la cGVHD où premièrement, les cellules dendritiques sont en nombre diminué (du moins dans la circulation), donc théoriquement ne forment pas la principale source d'IDO nécessaire pour prévenir la reprogrammation cellulaire. Deuxièmement, il est possible que l'IDO sécrétée par les Tregs puisse elle-même prévenir cette reprogrammation. Il serait intéressant d'évaluer dans un premier temps le taux d'IL-6 ainsi que l'expression de cytokines inflammatoires tel IFN- γ ou IL-17 par les Tregs chez les patients atteints de cGVHD réfractaire au début des traitements au TH9402.

Au niveau de la réponse *in vivo*, la photodéplétion est utilisée avec succès comme stratégie thérapeutique dans le traitement de la cGVHD (Roy et al, données non publiées). Cependant, la molécule la plus utilisée est le 8-MOP, qui agit différemment du TH9402. Comme il a été décrit plus haut, le 8-MOP se localise dans noyau de la cellule et exerce son effet cytotoxique en créant des liens covalents dans l'ADN, entraînant l'apoptose de toutes les cellules T. Par opposition, le TH9402 se localise dans la mitochondrie et n'est pas cytotoxique envers toutes les cellules T. Ainsi, les cellules non activées possédant une

pompe MDR-1 active peuvent également expulser la molécule, ce qui leur confère ainsi une résistance au traitement⁴³⁴. Les résultats du premier chapitre de cette thèse suggèrent que les Tregs survivent également grâce à l'activité de cette pompe. Le TH9402 exerce son effet cytotoxique via augmentation du stress oxydatif. Notre laboratoire a démontré que les cellules possédant un stress oxydatif à l'état basal plus élevé étaient plus sensibles au traitement au TH9402 (voir autres contributions, données non publiées). Des données préliminaires effectuées dans notre laboratoire démontrent que les Tregs possèdent à l'état basal un stress oxydatif moindre comparé aux cellules T activées (Résultats supplémentaires). Ceci pourrait également contribuer à la survie des Tregs au traitement. Ceci pourrait amener une explication supplémentaire quant à la survie des Tregs et des cellules T non activées au TH9402.

Au niveau de l'action physiologique exercée par ces deux agents photosensibles chez les patients souffrant de cGVHD, la disparité des mécanismes d'induction de mort cellulaire pourrait engendrer une réponse différente. Ceci peut être expliqué de plusieurs manières. Premièrement, il a été démontré que l'augmentation des Tregs chez les patients traités au 8-MOP était due à l'injection des cellules apoptotiques qui étaient phagocytées par les monocytes et cellules dendritiques immatures, entraînant un phénotype tolérogénique de ces dernières. Il n'est pas exclu qu'un tel effet pourrait se produire chez les patients traités à la photodéplétion au TH9402. Cependant, le fait que le TH9402 préserve les Tregs fonctionnels pourrait conférer au TH9402 un avantage thérapeutique. En effet, les patients traités à la photodéplétion au TH9402 n'ont reçu que 16 traitements alors qu'une quantité plus élevée de traitements était nécessaire afin d'obtenir des résultats similaires chez les patients traités au 8-MOP⁴³². Le mécanisme moléculaire par lequel le TH9402 induit une immunosuppression semble également différent de celui du 8-MOP. L'immunosuppression causée par le 8-MOP passe par une modulation des cellules dendritiques par les cellules apoptotiques. Cette modulation entraîne une expansion des Tregs par un mécanisme dépendant de « programmed death ligand-1 » (PDL-1) et alors que le niveau d'IDO demeure inchangé⁵¹⁵. Dans notre étude, nous avons observé que la

photodéplétion au TH9402 était associée à une augmentation rapide d'IDO dans les Tregs causée par l'activité de CTLA-4. Une telle augmentation n'est pas observée suite à la photodéplétion au 8-MOP. De plus, l'augmentation *in vivo* d'IDO dans les Tregs est observée rapidement après les premiers traitements comparativement aux traitements au 8-MOP. Ces deux molécules agissent donc de manières différentes. Ces deux thérapies pourraient mêmes être utilisées simultanément. Cependant, le fait que le 8-MOP soit toxique envers les Tregs pourrait réduire l'efficacité du TH9402. Afin d'optimiser l'efficacité du TH9402, une utilisation simultanée avec des agents immunosuppresseurs possédant une faible activité cytotoxique envers les Tregs tels que la prednisone, la rapamycine ou encore une combinaison avec une thérapie d'IL-2 à base dose serait préférable. La prise d'immunosuppresseurs fortement toxiques envers les Tregs tels que le CsA, le tacrolimus et les anticorps monoclonaux dirigés contre CD25 pourraient quant à eux diminuer l'efficacité de la photodéplétion au TH9402.

Le fait que la photodéplétion au TH9402 permet d'infuser des Tregs fonctionnels aux patients atteint de cGVHD pourrait permettre un raffinement de la technique de photophérèse extracorporelle dans un futur rapproché. En effet, si cette technique ne constituait qu'en l'élimination des cellules T alloréactives, le patient devrait subir une lymphophérèse, une photodéplétion *ex vivo* des cellules collectées, puis une réinjection de ses cellules à chaque traitement. La préservation des Tregs permet d'entrevoir une nouvelle stratégie permettant de diminuer le nombre de lymphophérèses. En effet, les cellules recueillies pourraient être traitées *ex vivo*, congelées en plusieurs aliquots, puis réinjectées au patient lors des traitements subséquents. Afin de pouvoir raffiner cette stratégie thérapeutique ainsi, il sera également impératif d'augmenter nos connaissances sur le rôle joué par les Tregs dans le contrôle de la réaction GVH. Ainsi, outre les cellules CD4⁺, les Tregs sont connus pour leur capacité d'inhibition de la réponse des cellules CD8⁺, ainsi que de réguler la réponse des cellules B et des APC. Une meilleure connaissance de l'interaction des Tregs avec ces cellules s'impose afin de pouvoir utiliser cette stratégie à plus grande échelle. À cette fin, nous désirons, dans un avenir rapproché, caractériser de

manière plus spécifique les Tregs exprimant IDO afin de mieux apprécier le rôle d'IDO dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Il sera également intéressant d'investiguer si la présence de ces Tregs exprimant IDO au niveau du tissu afin de pouvoir rapporter nos observations directement au lieu de l'inflammation. De plus, il sera également intéressant d'étudier l'interaction des Tregs préservés par la photodéplétion avec d'autres types cellulaires capables d'induire la tolérance et impliquées dans le développement de la cGVHD tel les cellules dendritiques ou les cellules B. Finalement, il sera important de s'assurer que l'expression in vivo d'IDO par les Tregs n'est pas restreinte aux patients atteints de cGVHD. Nous comptons donc étudier cette population sur des patients atteints d'autres désordres inflammatoires tels les patients atteints de maladies inflammatoires des intestins (maladie de Crohn et colite ulcéreuse), sclérose en plaque, lupus érythémateux etc...

Nos travaux démontrent clairement qu'une meilleure compréhension des mécanismes d'action de la thérapie photodynamique au TH9402 et des Tregs est non seulement intéressante au plan scientifique, mais qu'elle permet de développer de nouvelles stratégies de traitement qui ont le potentiel d'augmenter grandement la survie et la qualité de vie des patients souffrant de cGVHD et d'autres désordres immunologiques.

Conclusion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré que la photodéplétion permettait, dans un premier temps, d'éliminer sélectivement les cellules T alloréactives responsables de la GVHD chronique tout en épargnant les Tregs, qui ont un effet anti-inflammatoire. Nous avons découvert que les Tregs préservées pouvaient exercer un effet anti GVHD grâce à une sécrétion accrue d'IL-10 et à l'activité de CTLA-4. Par la suite, nous avons démontré que l'activité de CTLA-4 était associée à une augmentation de l'expression d'IDO par les cellules Tregs elles-mêmes. Cette expression d'IDO est associée à une augmentation de la population Tregs et à une expression accrue d'IL-10 par les cellules T

CD4+. De plus, l'infusion de cellules photodéplétées à des patients souffrant de cGVHD suivant un protocole de photophérese extra-corporelle permet d'augmenter la population Tregs chez ces patients sans entraîner de lymphopénie ni d'immunosuppression envers les infections. Ces résultats pourraient permettre de raffiner les techniques de traitements ainsi que d'augmenter la qualité de vie des patients souffrants de cGVHD.

De plus, nous avons démontré que les Tregs de donneurs sains pouvaient exprimerIDO en présence de signalisation de CTLA-4. Ceci implique que l'effet observé lors de nos études n'est pas restreint aux cellules provenant de patients souffrant de cGVHD. Le traitement à la photodéplétion au TH9402 pourrait éventuellement être utilisé dans le traitement d'autres maladies comportant un nombre diminué de Tregs.

Reference List

1. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
2. Evangelisti C, Evangelisti C, Bressanin D et al. Targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17:921-936.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol*. 1994;87:746-754.
4. Hartlapp I, Pallasch C, Weibert G et al. Depsipeptide induces cell death in Hodgkin lymphoma-derived cell lines. *Leuk Res*. 2009;33:929-936.
5. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-1235.
6. Ghilmini M. Follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2010;21 Suppl 7:vii151-vii153.
7. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324-339.
8. Colvin GA, Eifenbein GJ. The latest treatment advances for acute myelogenous leukemia. *Med Health R.I.* 2003;86:243-246.
9. Fruchtman S. Stem cell transplantation. *Mt Sinai J Med*. 2003;70:166-170.
10. Mainwaring MG, Rimsza LM, Chen SF et al. Treatment of refractory acute leukemia with timed sequential chemotherapy using topotecan followed by etoposide + mitoxantrone (T-EM) and correlation with topoisomerase II levels. *Leuk Lymphoma* 2002;43:989-999.
11. Montoto S, Canals C, Rohatiner AZ et al. Long-term follow-up of high-dose treatment with autologous haematopoietic progenitor cell support in 693 patients with follicular lymphoma: an EBMT registry study. *Leukemia* 2007;21:2324-2331.
12. Oliansky DM, Camitta B, Gaynon P et al. The role of cytotoxic therapy with hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia: update of the 2005 evidence-based review. ASBMT Position Statement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:979-981.

13. Cohen S, Kiss T, Lachance S et al. Tandem autologous-allogeneic nonmyeloablative sibling transplantation in relapsed follicular lymphoma leads to impressive progression-free survival with minimal toxicity. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2012;18:951-957.
 14. Friedberg JW, Freedman AS. High-dose therapy and stem cell transplantation in follicular lymphoma. *Ann.Hematol.* 1999;78:203-211.
 15. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2554-2559.
 16. Bjorkstrand B, Iacobelli S, Hegenbart U et al. Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up. *J.Clin.Oncol.* 2011;29:3016-3022.
 17. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby.* 351-370. 2001.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)
18. Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: minor histocompatibility antigens. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:171-187.
 19. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-389.
 20. Terra R, Labrecque N, Perreault C. Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules. *J.Immunol.* 2002;169:684-692.
 21. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby. Les cytokines.* 303-327. 2001.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)
22. Acuto O. T cell-dendritic cell interaction in vivo: random encounters favor development of long-lasting ties. *Sci.STKE.* 2003;2003:E28.
 23. Bastien, J. P. *Cours d'hématologie pour sciences biomédicales.* Université du Québec à Trois-Rivières. 2012. 20120.
- Ref Type: Unpublished Work
24. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog.Exp.Tumor Res.* 1970;13:1-27.

25. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1152-1167.
26. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
27. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 1989;7:145-173.
28. Donckier V, Abramowicz D, Bruyns C et al. IFN-gamma prevents Th2 cell-mediated pathology after neonatal injection of semiallogenic spleen cells in mice. *J.Immunol.* 1994;153:2361-2368.
29. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-669.
30. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005;307:430-433.
31. Ho IC, Vorhees P, Marin N et al. Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 1991;10:1187-1192.
32. Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol.Res.* 2003;28:25-37.
33. Zhu J, Davidson TS, Wei G et al. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells. *J Exp.Med.* 2009;206:329-341.
34. Takatori H, Kanno Y, Chen Z, O'Shea JJ. New complexities in helper T cell fate determination and the implications for autoimmune diseases. *Mod.Rheumatol.* 2008;18:533-541.
35. Bettelli E, Carrier Y, Gao W et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.
36. Zhou L, Lopes JE, Chong MM et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 2008;453:236-240.
37. Mucida D, Park Y, Kim G et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317:256-260.

38. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat.Immunol* 2008;9:194-202.
39. Puga I, Rao A, Macian F. Targeted cleavage of signaling proteins by caspase 3 inhibits T cell receptor signaling in anergic T cells. *Immunity*. 2008;29:193-204.
40. Soto-Nieves N, Puga I, Abe BT et al. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp.Med.* 2009;206:867-876.
41. Pallandre JR, Brillard E, Crehange G et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 2007;179:7593-7604.
42. Bouguermouh S, Fortin G, Baba N, Rubio M, Sarfati M. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. *PLoS.ONE*. 2009;4:e5087.
43. Lohr J, Knoechel B, Jiang S, Sharpe AH, Abbas AK. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat.Immunol* 2003;4:664-669.
44. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12:431-440.
45. Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*. 1996;5:285-293.
46. Laurence A, Tato CM, Davidson TS et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*. 2007;26:371-381.
47. Leveque L, Deknuydt F, Bioley G et al. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother.* 2009;32:101-108.
48. Orabona C, Pallotta MT, Grohmann U. Different partners, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol.Med.* 2012;18:834-842.
49. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat.Immunol.* 2011;12:870-878.
50. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat.Rev.Immunol.* 2009;9:83-89.

51. Maitra U, Davis S, Reilly CM, Li L. Differential regulation of Foxp3 and IL-17 expression in CD4 T helper cells by IRAK-1. *J Immunol* 2009;182:5763-5769.
52. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* 2007;179:2041-2045.
53. .
Ref Type: Generic
54. Xu J, Yang Y, Qiu G et al. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol* 2009;182:6226-6236.
55. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744-748.
56. .
Ref Type: Generic
57. Wolk K, Haugen HS, Xu W et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol.Med.* 2009;87:523-536.
58. Wahl C, Wegenka UM, Leithauser F, Schirmbeck R, Reimann J. IL-22-dependent attenuation of T cell-dependent (ConA) hepatitis in herpes virus entry mediator deficiency. *J Immunol* 2009;182:4521-4528.
59. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat.Med.* 2008;14:275-281.
60. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat.Med.* 2008;14:282-289.
61. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu.Rev.Immunol* 2009;27:485-517.
62. Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Yang JC. IL-17 secreted by tumor reactive T cells induces IL-8 release by human renal cancer cells. *J Immunother.* 2009;32:109-117.
63. Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M et al. IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 2000;105:1697-1710.

64. Lubberts E, van Den BL, Oppers-Walgreen B et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003;170:2655-2662.
65. Wolk K, Haugen HS, Xu W et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol.Med.* 2009;87:523-536.
66. Loser K, Apelt J, Voskort M et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol* 2007;179:365-371.
67. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M et al. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007;13:4345-4354.
68. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp.Med.* 2005;202:1075-1085.
69. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005;102:419-424.
70. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
71. Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112:258-267.
72. Zheng Y, Manzotti CN, Burke F et al. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+. *J Immunol* 2008;181:1683-1691.
73. Krawczyk CM, Shen H, Pearce EJ. Functional plasticity in memory T helper cell responses. *J.Immunol.* 2007;178:4080-4088.
74. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009;30:646-655.
75. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur.J.Immunol.* 2008;38:1654-1663.
76. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 1995;155:1151-1164.

77. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat.Immunol* 2003;4:330-336.
78. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
79. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.* 2001;27:68-73.
80. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat.Immunol* 2006;7:401-410.
81. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺. *J Clin Invest* 2003;112:1437-1443.
82. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells. *Eur.J Immunol* 2007;37:129-138.
83. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103:6659-6664.
84. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D et al. CD49d provides access to "untouched" human Foxp3⁺ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 2009;113:827-836.
85. Tang Q, Adams JY, Penaranda C et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity.* 2008;28:687-697.
86. Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y et al. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity.* 2009;31:932-940.
87. Bommireddy R, Doetschman T. TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol.Med.* 2007;13:492-501.

88. Burchill MA, Yang J, Vang KB et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity*. 2008;28:112-121.
89. Moran AE, Holzapfel KL, Xing Y et al. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J.Exp.Med.* 2011;208:1279-1289.
90. Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM et al. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 2014
91. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 2012;150:29-38.
92. Arpaia N, Campbell C, Fan X et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;504:451-455.
93. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 2006;176:3593-3602.
94. von Boehmer H, Nolting J. What turns on Foxp3? *Nat.Immunol* 2008;9:121-122.
95. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y et al. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat.Immunol* 2008;9:194-202.
96. Fantini MC, Becker C, Monteleone G et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J Immunol* 2004;172:5149-5153.
97. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006;25:195-201.
98. Asano N, Watanabe T, Kitani A, Fuss IJ, Strober W. Notch1 signaling and regulatory T cell function. *J Immunol* 2008;180:2796-2804.
99. Vigouroux S, Yvon E, Wagner HJ et al. Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol.* 2003;77:10872-10880.
100. Housley WJ, O'Connor CA, Nichols F et al. PPAR{gamma} regulates retinoic acid-mediated DC induction of Tregs. *J Leukoc.Biol* 2009

101. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006;108:1571-1579.
102. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:280-290.
103. Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Yamamoto M et al. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J Immunol* 2008;181:3897-3905.
104. Zou T, Caton AJ, Koretzky GA, Kambayashi T. Dendritic cells induce regulatory T cell proliferation through antigen-dependent and -independent interactions. *J.Immunol.* 2010;185:2790-2799.
105. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS.Biol* 2007;5:e329.
106. Yates J, Rovis F, Mitchell P et al. The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int.Immunol* 2007;19:785-799.
107. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* 2007;179:2041-2045.
108. Kinjyo I, Inoue H, Hamano S et al. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp.Med.* 2006;203:1021-1031.
109. Fragale A, Gabriele L, Stellacci E et al. IFN regulatory factor-1 negatively regulates CD4+ CD25+ regulatory T cell differentiation by repressing Foxp3 expression. *J Immunol* 2008;181:1673-1682.
110. Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G et al. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)/CD4+ T-cell subset. *Blood* 2005;105:2877-2886.
111. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225-1232.

112. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176:4622-4631.
113. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
114. Zheng Y, Manzotti CN, Burke F et al. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+. *J Immunol* 2008;181:1683-1691.
115. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008;181:5396-5404.
116. Zheng Y, Manzotti CN, Burke F et al. Acquisition of suppressive function by activated human CD4+. *J Immunol* 2008;181:1683-1691.
117. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur.J Immunol* 2007;37:884-895.
118. Cao X, Cai SF, Fehniger TA et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27:635-646.
119. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol.Life Sci.* 2009
120. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat.Immunol* 2008;9:239-244.
121. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp.Med.* 2007;204:1257-1265.
122. Choi BM, Pae HO, Jeong YR, Kim YM, Chung HT. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 2005;327:1066-1071.
123. Xia ZW, Zhong WW, Xu LQ et al. Heme oxygenase-1-mediated CD4+CD25high regulatory T cells suppress allergic airway inflammation. *J Immunol* 2006;177:5936-5945.
124. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat.Immunol* 2007;8:1353-1362.

125. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol.* 2008;8:523-532.
126. Cong Y, Feng T, Fujihashi K, Schoeb TR, Elson CO. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009;106:19256-19261.
127. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;63:1455-1463.
128. Miyoshi H, Uchida K, Taniguchi T et al. Circulating naive and CD4+CD25high regulatory T cells in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2008;36:133-140.
129. Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H et al. Involvement of inducible costimulator- and interleukin 10-positive regulatory T cells in the development of IgG4-related autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2011;40:1120-1130.
130. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 2000;12:171-181.
131. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 2000;12:171-181.
132. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp.Med.* 2005;201:1061-1067.
133. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006;212:28-50.
134. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;105:1162-1169.
135. Astier AL. T-cell regulation by CD46 and its relevance in multiple sclerosis. *Immunology* 2008;124:149-154.
136. Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol* 2005;175:6107-6116.

137. Billerbeck E, Blum HE, Thimme R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁻ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 2007;179:1039-1048.
138. Joosten SA, van Meijgaarden KE, Savage ND et al. Identification of a human CD8⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007;104:8029-8034.
139. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E et al. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* 2003;102:4107-4114.
140. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005;115:2904-2913.
141. Mahic M, Henjum K, Yaqub S et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾FOXP3⁽⁺⁾ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur.J Immunol* 2008;38:640-646.
142. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G et al. Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺. *J Immunol* 1998;161:5193-5202.
143. Jiang S, Tugulea S, Pennesi G et al. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum.Immunol* 1998;59:690-699.
144. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat.Immunol* 2002;3:237-243.
145. Kim-Schulze S, Scotto L, Vlad G et al. Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th anergy and differentiation of CD8⁺ T suppressor cells. *J Immunol* 2006;176:2790-2798.
146. Davila E, Kang YM, Park YW et al. Cell-based immunotherapy with suppressor CD8⁺ T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005;174:7292-7301.
147. Uss E, Rowshani AT, Hooibrink B et al. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2006;177:2775-2783.
148. Allez M, Brimnes J, Dotan I, Mayer L. Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:1516-1526.

149. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp.Med.* 2002;195:695-704.
150. Wei S, Kryczek I, Zou L et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:5020-5026.
151. McIver Z, Serio B, Dunbar A et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br.J Haematol.* 2008;141:170-178.
152. Gualco G, van den BA, Koopmans S et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with a new minimal deletion in the death domain of the FAS gene. *Hum.Pathol.* 2008;39:137-141.
153. Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol.Cell Biol.* 2010;88:771-780.
154. Peng G, Wang HY, Peng W et al. Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity.* 2007;27:334-348.
155. Groh V, Rhinehart R, Secrist H et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:6879-6884.
156. Rhodes KA, Andrew EM, Newton DJ, Tramonti D, Carding SR. A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur.J Immunol* 2008;38:2274-2283.
157. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005;22:329-341.
158. Fernandez I, Zeiser R, Karsunky H et al. CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179:2808-2814.
159. Zhao D, Zhang C, Yi T et al. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2129-2138.
160. Endharti AT, Rifa'I M, Shi Z et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 2005;175:7093-7097.

161. Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Hum.Immunol* 2008;69:781-789.
162. Voo KS, Wang YH, Santori FR et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2009;106:4793-4798.
163. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009;113:4240-4249.
164. Radhakrishnan S, Cabrera R, Schenk EL et al. Reprogrammed FoxP3+ T regulatory cells become IL-17+ antigen-specific autoimmune effectors in vitro and in vivo. *J Immunol* 2008;181:3137-3147.
165. Hayaishi O, Hirata F, Ohnishi T et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase: incorporation of $^{18}O_2$ and $^{18}O_2$ into the reaction products. *J.Biol.Chem.* 1977;252:3548-3550.
166. Kim HR, Lee A, Choi EJ et al. Reactive Oxygen Species Prevent Imiquimod-Induced Psoriatic Dermatitis through Enhancing Regulatory T Cell Function. *PLoS.ONE.* 2014;9:e91146.
167. Kim YH, Choi BK, Kang WJ et al. IFN-gamma-indoleamine-2,3 dioxygenase acts as a major suppressive factor in 4-1BB-mediated immune suppression in vivo. *J.Leukoc.Biol.* 2009;85:817-825.
168. Mellor AL, Chandler P, Baban B et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int.Immunol.* 2004;16:1391-1401.
169. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J.Immunol.* 2004;172:4100-4110.
170. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 2009;113:2394-2401.
171. Munn DH, Zhou M, Attwood JT et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-1193.
172. Lee GK, Park HJ, Macleod M et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002;107:452-460.
173. Munn DH, Sharma MD, Hou D et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J.Clin.Invest* 2004;114:280-290.

174. Fuchs D, Moller AA, Reibnegger G et al. Increased endogenous interferon-gamma and neopterin correlate with increased degradation of tryptophan in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunol.Lett.* 1991;28:207-211.
175. Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR et al. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:17073-17078.
176. Hou DY, Muller AJ, Sharma MD et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res.* 2007;67:792-801.
177. Munn DH. Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity. *Front Biosci.(Elite.Ed)* 2012;4:734-745.
178. Metz R, Duhadaway JB, Rust S et al. Zinc protoporphyrin IX stimulates tumor immunity by disrupting the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol.Cancer Ther.* 2010;9:1864-1871.
179. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat.Med.* 2011;17:1094-1100.
180. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat.Rev.Immunol.* 2007;7:817-823.
181. Munn DH, Sharma MD, Baban B et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 2005;22:633-642.
182. Forouzandeh F, Jalili RB, Germain M, Duronio V, Ghahary A. Skin cells, but not T cells, are resistant to indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expressed by allogeneic fibroblasts. *Wound.Repair Regen.* 2008;16:379-387.
183. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death.Differ.* 2002;9:1069-1077.
184. Sharma MD, Hou DY, Liu Y et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 2009;113:6102-6111.
185. Yan Y, Zhang GX, Gran B et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 2010;185:5953-5961.

186. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J.Clin.Invest* 2007;117:1147-1154.
187. Wang Q, Jiang H, Fan Y et al. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) alleviates benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced cell cycle arrest and apoptosis in human cells. *Environ.Toxicol.Pharmacol.* 2011;31:18-24.
188. An H, Hou J, Zhou J et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nat.Immunol.* 2008;9:542-550.
189. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:20828-20833.
190. Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat.Rev.Immunol.* 2008;8:74-80.
191. BARNES DW, CORP MJ, LOUTIT JF, NEAL FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br.Med.J.* 1956626-627.
192. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2005;11:945-956.
193. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am.J.Med.* 1980;69:204-217.
194. Arora M, Nagaraj S, Witte J et al. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:149-153.
195. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:756-762.
196. Saliba RM, de LM, Giralt S et al. Hyperacute GVHD: risk factors, outcomes, and clinical implications. *Blood* 2007;109:2751-2758.
197. Vogt MH, van den Muijsenberg JW, Goulmy E et al. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood* 2002;99:3027-3032.

198. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J.Exp.Med.* 2004;199:1133-1142.
199. Randolph SS, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004;103:347-352.
200. Couriel DR, Saliba R, Escalon MP et al. Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease. *Br.J.Haematol.* 2005;130:409-417.
201. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int.J.Hematol.* 2003;78:181-187.
202. Moalic V, Ferec C. [Graft vs host disease]. *Pathol.Biol.(Paris)* 2006;54:304-308.
203. Reddy P, Ferrara JL. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev.* 2003;17:187-194.
204. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu.Rev.Med.* 2003;54:29-52.
205. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 1999;5:347-356.
206. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR et al. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997;90:3204-3213.
207. Paris F, Fuks Z, Kang A et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-297.
208. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994;83:2360-2367.
209. Ichiki Y, Bowlus CL, Shimoda S et al. T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun.Rev.* 2006;5:1-9.
210. Teshima T, Ferrara JL. Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin.Hematol.* 2002;39:15-22.

211. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-305.
212. Turner BE, Kambouris ME, Sinfield L et al. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplant determines the kinetics of acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2008;86:968-976.
213. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood* 2009;114:4919-4927.
214. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., and Osborne, B. A. *Immunologie, Le cours de Janis Kuby.* 239-267. 2006.
- Ref Type: Serial (Book,Monograph)
215. Bromley SK, Burack WR, Johnson KG et al. The immunological synapse. *Annu.Rev.Immunol.* 2001;19:375-396.
216. Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J.Immunol.* 2000;164:4564-4568.
217. Teshima T, Ordemann R, Reddy P et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat.Med.* 2002;8:575-581.
218. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 2004;172:7393-7398.
219. Breathnach SM, Katz SI. Immunopathology of cutaneous graft-versus-host disease. *Am.J.Dermatopathol.* 1987;9:343-348.
220. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat.Med.* 2004;10:510-517.
221. Sallusto F, Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S127-S132.
222. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P et al. Immune Cell Subset Counts Associated with Graft-versus-Host Disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2014;20:450-462.
223. Watanabe N, Narita M, Furukawa T et al. Kinetics of pDCs, mDCs, gammadeltaT cells and regulatory T cells in association with graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int.J.Lab Hematol.* 2011;33:378-390.

224. Matte CC, Liu J, Cormier J et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat.Med.* 2004;10:987-992.
225. Kebriaei P, Saliba RM, Ma C et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after rituximab-containing myeloablative preparative regimen for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:203-209.
226. Kamble R, Oholendt M, Carrum G. Rituximab responsive refractory acute graft-versus-host disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2006;12:1201-1202.
227. Ratanatharathorn V, Logan B, Wang D et al. Prior rituximab correlates with less acute graft-versus-host disease and better survival in B-cell lymphoma patients who received allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Br.J.Haematol.* 2009;145:816-824.
228. Lin MT, Storer B, Martin PJ et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 2003;349:2201-2210.
229. Baker KS, Roncarolo MG, Peters C et al. High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1123-1129.
230. Michonneau D, Peffault de LR, Porcher R et al. Influence of bone marrow graft B lymphocyte subsets on outcome after HLA-identical sibling transplants. *Br.J.Haematol.* 2009;145:107-114.
231. Ho IC, Glimcher LH. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 2002;109 Suppl:S109-S120.
232. Xu J, Wei J, Zhu X et al. Increased plasma indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interferon-gamma levels correlate with the severity of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2013;19:196-201.
233. Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD et al. Differential effects of the absence of interferon-gamma and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J.Clin.Invest* 1998;102:1742-1748.
234. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A et al. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 2009;114:5062-5070.

235. Ammer J. Influence of IFN γ on induction of IDO in a human in vitro skin graft-versus- [abstract]. Cellular, Gene therapies and Cytokines 2012;
236. Nikolic B, Lee S, Bronson RT, Grusby MJ, Sykes M. Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J.Clin.Invest* 2000;105:1289-1298.
237. Cheng H, Tian J, Li Z et al. TH17 cells are critical for skin-specific pathological injury in acute graft-versus-host disease. *Transplant.Proc.* 2012;44:1412-1418.
238. Fandrich F, Zepernick-Kalinski C, Gebhardt H et al. The role of natural killer cell mediated caspases activation in a graft-versus-host disease model of semiallogeneic small bowel transplantation. *Transpl.Immunol.* 1999;7:1-7.
239. Engh E, Benestad HB, Strom-Gundersen I et al. Role of classical (RT1.A) and nonclassical (RT1.C) MHC class I regions in natural killer cell-mediated bone marrow allograft rejection in rats. *Transplantation* 1998;65:319-324.
240. Koenecke C, Shaffer J, Alexander SI et al. NK cell recovery, chimerism, function, and recognition in recipients of haploidentical hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning using a humanized anti-CD2 mAb, Medi-507. *Exp.Hematol.* 2003;31:911-923.
241. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
242. Asai O, Longo DL, Tian ZG et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest* 1998;101:1835-1842.
243. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754-2759.
244. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp.Hematol.* 2001;29:259-277.
245. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-530.
246. Ferrara JL. Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 2000;9:299-306.

247. Via CS, Nguyen P, Shustov A, Drappa J, Elkon KB. A major role for the Fas pathway in acute graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 1996;157:5387-5393.
248. Baker MB, Altman NH, Podack ER, Levy RB. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J.Exp.Med.* 1996;183:2645-2656.
249. Graubert TA, DiPersio JF, Russell JH, Ley TJ. Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest* 1997;100:904-911.
250. van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:273-281.
251. Ueno Y, Ishii M, Yahagi K et al. Fas-mediated cholangiopathy in the murine model of graft versus host disease. *Hepatology* 2000;31:966-974.
252. Kanda Y, Tanaka Y, Shirakawa K et al. Increased soluble Fas-ligand in sera of bone marrow transplant recipients with acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:751-754.
253. Sayegh MH, Turka LA. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995;6:1143-1150.
254. George JF, Sweeney SD, Kirklin JK et al. An essential role for Fas ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow. *Nat.Med.* 1998;4:333-335.
255. Jiang Z, Podack E, Levy RB. Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4(+) donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis. *Blood* 2001;98:390-397.
256. Martin PJ, Akatsuka Y, Hahne M, Sale G. Involvement of donor T-cell cytotoxic effector mechanisms in preventing allogeneic marrow graft rejection. *Blood* 1998;92:2177-2181.
257. Ju ST, Panka DJ, Cui H et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444-448.
258. Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J.Exp.Med.* 1996;183:657-661.

259. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2001;2:675-680.
260. Brown GR, Lindberg G, Meddings J et al. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease. *Gastroenterology* 1999;116:593-601.
261. Brown GR, Thiele DL. T-cell activation and differentiation are regulated by TNF during murine DBA/2-->B6D2F1 intestinal graft-versus-host disease. *J.Clin.Immunol.* 2000;20:379-388.
262. Brown GR, Lee E, Thiele DL. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-->C57BL/6J x bm12)F1 mice. *J.Immunol.* 2002;168:3065-3071.
263. Hill GR, Teshima T, Rebel VI et al. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J.Immunol.* 2000;164:656-663.
264. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J.Exp.Med.* 1992;175:405-413.
265. Schmaltz C, Alpdogan O, Muriglan SJ et al. Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood* 2003;101:2440-2445.
266. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest* 2001;107:1581-1589.
267. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J.Cell Sci.* 1999;112 (Pt 1):137-146.
268. Schmitz H, Fromm M, Bode H et al. Tumor necrosis factor-alpha induces Cl- and K+ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E2. *Am.J.Physiol* 1996;271:G669-G674.
269. Radojevic N, McKay DM, Merger M et al. Characterization of enteric functional changes evoked by in vivo anti-CD3 T cell activation. *Am.J.Physiol* 1999;276:R715-R723.
270. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J.Immunol.* 1988;141:2629-2634.

271. Thiele DL, Eigenbrodt ML, Bryde SE, Eigenbrodt EH, Lipsky PE. Intestinal graft-versus-host disease is initiated by donor T cells distinct from classic cytotoxic T lymphocytes. *J.Clin.Invest* 1989;84:1947-1956.
272. Cooke KR, Hill GR, Gerbitz A et al. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduces lung injury after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2000;70:272-279.
273. Brown GR, Lee EL, Thiele DL. TNF enhances CD4+ T cell alloproliferation, IFN-gamma responses, and intestinal graft-versus-host disease by IL-12-independent mechanisms. *J.Immunol.* 2003;170:5082-5088.
274. El Hayek JM, Rogers TE, Brown GR. The role of TNF in hepatic histopathological manifestations and hepatic CD8+ T cell alloresponses in murine MHC class I disparate GVHD. *J.Leukoc.Biol.* 2005;78:1001-1007.
275. Hattori K, Hirano T, Miyajima H et al. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 1998;91:4051-4055.
276. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J.Exp.Med.* 1987;166:1280-1289.
277. Abhyankar S, Gilliland DG, Ferrara JL. Interleukin-1 is a critical effector molecule during cytokine dysregulation in graft versus host disease to minor histocompatibility antigens. *Transplantation* 1993;56:1518-1523.
278. Hill GR, Teshima T, Gerbitz A et al. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J.Clin.Invest* 1999;104:459-467.
279. McCarthy PL, Jr., Abhyankar S, Neben S et al. Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. *Blood* 1991;78:1915-1918.
280. Antin JH, Weisdorf D, Neuberg D et al. Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:3479-3482.
281. Langrehr JM, Murase N, Markus PM et al. Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J.Clin.Invest* 1992;90:679-683.

282. Nestel FP, Greene RN, Kichian K, Ponka P, Lapp WS. Activation of macrophage cytostatic effector mechanisms during acute graft-versus-host disease: release of intracellular iron and nitric oxide-mediated cytostasis. *Blood* 2000;96:1836-1843.
283. Trenado A, Charlotte F, Fisson S et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688-1696.
284. Cohen JL, Boyer O. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr.Opin.Immunol* 2006;18:580-585.
285. Huang Y, Bozulic LD, Miller T et al. CD8 α + plasmacytoid precursor DCs induce antigen-specific regulatory T cells that enhance HSC engraftment in vivo. *Blood* 2011;117:2494-2505.
286. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J.Exp.Med.* 2002;196:389-399.
287. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-3499.
288. Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005;105:1828-1836.
289. Cardenas PA, Huang Y, Ildstad ST. The role of pDC, recipient T(reg) and donor T(reg) in HSC engraftment: Mechanisms of facilitation. *Chimerism.* 2011;2:65-70.
290. Mutis T, Aarts-Riemens T, Verdonck LF. The association of CD25 expression on donor CD8+ and CD4+ T cells with graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions. *Haematologica* 2005;90:1389-1395.
291. Li Q, Zhai Z, Xu X et al. Decrease of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and TGF-beta at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell transplantation. *Leuk.Res.* 2010;34:1158-1168.
292. Vela-Ojeda J, Montiel-Cervantes L, Granados-Lara P et al. Role of CD4+CD25+highFoxp3+CD62L+ regulatory T cells and invariant NKT cells in

- human allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Dev.* 2010;19:333-340.
293. Fondi C, Nozzoli C, Benemei S et al. Increase in FOXP3+ regulatory T cells in GVHD skin biopsies is associated with lower disease severity and treatment response. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:938-947.
294. Magenau JM, Qin X, Tawara I et al. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:907-914.
295. Reddy V, Iturraspe JA, Tzolas AC et al. Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* 2004;103:4330-4335.
296. Mohty M, Blaise D, Faucher C et al. Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2005;19:1-6.
297. Rajasekar R, Lakshmi KM, George B et al. Dendritic cell count in the graft predicts relapse in patients with hematologic malignancies undergoing an HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2010;16:854-860.
298. Merad M, Hoffmann P, Ranheim E et al. Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat.Med.* 2004;10:510-517.
299. Collin MP, Hart DN, Jackson GH et al. The fate of human Langerhans cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J.Exp.Med.* 2006;203:27-33.
300. Rosenzweig M, Dhedin N, Maury S et al. Regulatory T cell content in the bone marrow graft does not predict the occurrence of acute GVHD. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:265-269.
301. Ukena SN, Velaga S, Geffers R et al. Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011;118:e82-e92.
302. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci.Transl.Med.* 2010;2:17ra10.
303. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Sharpe AH, Vallera DA. Opposing roles of CD28:B7 and CTLA-4:B7 pathways in regulating in vivo alloresponses in murine recipients of MHC disparate T cells. *J.Immunol.* 1999;162:6368-6377.

304. Sucher R, Fischler K, Oberhuber R et al. IDO and regulatory T cell support are critical for cytotoxic T lymphocyte-associated Ag-4 Ig-mediated long-term solid organ allograft survival. *J.Immunol.* 2012;188:37-46.
305. Landfried K, Zhu W, Waldhler MC et al. Tryptophan catabolism is associated with acute GVHD after human allogeneic stem cell transplantation and indicates activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Blood* 2011;118:6971-6974.
306. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A et al. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 2009;114:5062-5070.
307. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2008;111:3257-3265.
308. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 2012;119:285-295.
309. Reinherz EL, Parkman R, Rapoport J, Rosen FS, Schlossman SF. Aberrations of suppressor T cells in human graft-versus-host disease. *N.Engl.J Med.* 1979;300:1061-1068.
310. Allen RD, Staley TA, Sidman CL. Differential cytokine expression in acute and chronic murine graft-versus-host-disease. *Eur.J.Immunol.* 1993;23:333-337.
311. Okubo T, Hagiwara E, Ohno S et al. Administration of an IL-12-encoding DNA plasmid prevents the development of chronic graft-versus-host disease (GVHD). *J.Immunol.* 1999;162:4013-4017.
312. Gowdy KM, Nugent JL, Martinu T et al. Protective role of T-bet and Th1 cytokines in pulmonary graft-versus-host disease and peribronchiolar fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2012;46:249-256.
313. Malard F, Bossard C, Brissot E et al. Increased Th17/Treg ratio in chronic liver GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2014
314. Gowdy KM, Nugent JL, Martinu T et al. Protective role of T-bet and Th1 cytokines in pulmonary graft-versus-host disease and peribronchiolar fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2012;46:249-256.
315. Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Rev.* 2006;20:15-27.

316. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M et al. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood* 2009;113:2888-2894.
317. Krenger W, Rossi S, Piali L, Hollander GA. Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood* 2000;96:347-354.
318. Min CK. The pathophysiology of chronic graft-versus-host disease: the unveiling of an enigma. *Korean J.Hematol.* 2011;46:80-87.
319. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu.Rev.Immunol* 2006;24:657-679.
320. Dardalhon V, Jaleco S, Kinet S et al. IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:9277-9282.
321. Hassan J, Reen DJ. Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. *J Immunol* 2001;167:1970-1976.
322. Jaleco S, Swainson L, Dardalhon V et al. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2003;171:61-68.
323. Thiant S, Labalette M, Trauet J et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010
324. Heninger AK, Theil A, Wilhelm C et al. IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J.Immunol.* 2012;189:5649-5658.
325. Hakim FT, Gress RE. Thymic involution: implications for self-tolerance. *Methods Mol.Biol* 2007;380:377-390.
326. Landfried K, Wolff D, Holler E. Pathophysiology and management of graft-versus-host disease in the era of reduced-intensity conditioning. *Curr.Opin.Oncol* 2009;21 Suppl 1:S39-S41.
327. Link H, Battmer K, Stumme C. Cytomegalovirus infection in leucocytes after bone marrow transplantation demonstrated by mRNA in situ hybridization. *Br.J.Haematol.* 1993;85:573-577.

328. Pavletic SZ, Smith LM, Bishop MR et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem-cell transplantation. *Am.J.Hematol.* 2005;78:265-274.
329. Kawano N, Gondo H, Kamimura T et al. Chronic graft-versus-host disease following varicella-zoster virus infection in allogeneic stem cell transplant recipients. *Int.J Hematol* 2003;78:370-373.
330. Matsuoka K, Kim HT, McDonough S et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4+ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2010;120:1479-1493.
331. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104:2187-2193.
332. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006;107:1717-1723.
333. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-2911.
334. Arimoto K, Kadowaki N, Ishikawa T, Ichinohe T, Uchiyama T. FOXP3 expression in peripheral blood rapidly recovers and lacks correlation with the occurrence of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Int.J Hematol* 2007;85:154-162.
335. Meignin V, Peffault dL, Zuber J et al. Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exp.Hematol* 2005;33:894-900.
336. Imanguli MM, Cowen EW, Rose J et al. Comparative analysis of FoxP3 regulatory T cells in the target tissues and blood in chronic graft versus host disease. *Leukemia* 2014
337. Ukena SN, Grosse J, Mischak-Weissinger E et al. Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25 (high)CD127 (low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol* 2011;90:213-218.
338. Dander E, Balduzzi A, Zappa G et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009;88:1261-1272.

339. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B et al. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:3804-3813.
340. Radojcic V, Pletneva MA, Yen HR et al. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *J.Immunol.* 2010;184:764-774.
341. Ratajczak P, Janin A, Peffault dL et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host-disease. *Blood* 2010
342. Yi T, Zhao D, Lin CL et al. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2101-2110.
343. Xu J, Yang Y, Qiu G et al. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J Immunol* 2009;182:6226-6236.
344. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103:6659-6664.
345. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum.Immunol* 2005;66:13-20.
346. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur.J Immunol* 2007;37:129-138.
347. Feng T, Cao AT, Weaver CT, Elson CO, Cong Y. IL-12 Converts Foxp3 + Regulatory T Cells to Foxp3 + IFN-gamma + T Cells with Inhibitory Functions During Induction of Colitis. *Gastroenterology* 2011
348. Bucher C, Koch L, Vogtenhuber C et al. IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood* 2009;114:5375-5384.
349. Kappel LW, Goldberg GL, King CG et al. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113:945-952.
350. Radojcic V, Pletneva MA, Yen HR et al. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *J Immunol* 2010;184:764-774.

351. Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G et al. Depletion of T lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leukaemic marrow transplant recipients. *Lancet* 1984;1:472-476.
352. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet* 1987;2:175-178.
353. Lanza L, Scudeletti M, Puppo F et al. Prednisone increases apoptosis in in vitro activated human peripheral blood T lymphocytes. *Clin Exp.Immunol* 1996;103:482-490.
354. Fattorossi A, Battaglia A, Buzzonetti A et al. Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment. *Immunology* 2005;116:134-141.
355. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*. 2002;17:167-178.
356. Satake A, Schmidt AM, Archambault A et al. Differential targeting of IL-2 and T cell receptor signaling pathways selectively expands regulatory T cells while inhibiting conventional T cells. *J.Autoimmun.* 2013;44:13-20.
357. Satake A, Schmidt AM, Nomura S, Kambayashi T. Inhibition of Calcineurin Abrogates While Inhibition of mTOR Promotes Regulatory T Cell Expansion and Graft-Versus-Host Disease Protection by IL-2 in Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *PLoS.ONE*. 2014;9:e92888.
358. Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Bocian K et al. The influence of immuosuppressive therapy on the development of CD4+CD25+ T cells after renal transplantation. *Transplant.Proc.* 2007;39:2721-2723.
359. Verdonk RC, Haagsma EB, Jonker MR et al. Effects of different immunosuppressive regimens on regulatory T-cells in noninflamed colon of liver transplant recipients. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2007;13:703-709.
360. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M et al. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:643-653.
361. Kohrt HE, Turnbull BB, Heydari K et al. TLI and ATG conditioning with low risk of graft-versus-host disease retains antitumor reactions after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *Blood* 2009;114:1099-1109.

362. Socie G, Schmoor C, Bethge WA et al. Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood* 2011;117:6375-6382.
363. Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V et al. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood* 2011;117:6963-6970.
364. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G et al. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:560-565.
365. van Lint MT, Milone G, Leotta S et al. 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* 2006;107:4177-4181.
366. Bacigalupo A. Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:225-231.
367. Paczesny S, Choi SW, Ferrara JL. Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies. *Curr.Opin.Hematol* 2009;16:427-436.
368. Malladi RK, Peniket AJ, Littlewood TJ et al. Alemtuzumab markedly reduces chronic GVHD without affecting overall survival in reduced-intensity conditioning sibling allo-SCT for adults with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43:709-715.
369. Skert C, Damiani D, Michelutti A et al. Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:729-737.
370. Levine JE, Paczesny S, Mineishi S et al. Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008;111:2470-2475.
371. Patriarca F, Sperotto A, Damiani D et al. Infliximab treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 2004;89:1352-1359.
372. Veeraputhiran M, Mangan K. Sudden loss of the GVL effect following use of the TNF inhibitor infliximab in a chronic myelogenous leukemia patient with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1113-1114.
373. Porter SB, Liu B, Rogosheske J et al. Suppressor function of umbilical cord blood-derived CD4+CD25+ T-regulatory cells exposed to graft-versus-host disease drugs. *Transplantation* 2006;82:23-29.

374. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S et al. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J.Immunol.* 2001;167:1945-1953.
375. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR et al. Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood* 2009;114:511-517.
376. Basara N, Kiehl MG, Blau W et al. Mycophenolate Mofetil in the treatment of acute and chronic GVHD in hematopoietic stem cell transplant patients: four years of experience. *Transplant.Proc.* 2001;33:2121-2123.
377. Takami A, Mochizuki K, Okumura H et al. Mycophenolate mofetil is effective and well tolerated in the treatment of refractory acute and chronic graft-versus-host disease. *Int.J Hematol* 2006;83:80-85.
378. Saven A, Piro L. Newer purine analogues for the treatment of hairy-cell leukemia. *N Engl.J Med.* 1994;330:691-697.
379. Jacobsohn DA, Chen AR, Zahurak M et al. Phase II study of pentostatin in patients with corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 2007;25:4255-4261.
380. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp.Med.* 2002;196:389-399.
381. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juscinska J et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+C. *Clin Immunol* 2009;133:22-26.
382. Trzonkowski P, Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M et al. Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs.* 2013;27:605-614.
383. Sagoo P, Ali N, Garg G et al. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci.Transl.Med.* 2011;3:83ra42.
384. Feng G, Nadig SN, Backdahl L et al. Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection. *Sci.Transl.Med.* 2011;3:83ra40.

385. Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK et al. Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci.Transl.Med.* 2011;3:83ra41.
386. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921-3928.
387. Hicheri Y, Bouchekioua A, Hamel Y et al. Donor regulatory T cells identified by FoxP3 expression but also by the membranous CD4+CD127low/neg phenotype influence graft-versus-tumor effect after donor lymphocyte infusion. *J Immunother.* 2008;31:806-811.
388. Zorn E, Mohseni M, Kim H et al. Combined CD4+ donor lymphocyte infusion and low-dose recombinant IL-2 expand FOXP3+ regulatory T cells following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2009;15:382-388.
389. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N.Engl.J.Med.* 2011;365:2055-2066.
390. Matsuoka K, Koreth J, Kim HT et al. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci.Transl.Med.* 2013;5:179ra43.
391. Via CS, Rus V, Nguyen P, Linsley P, Gause WC. Differential effect of CTLA4Ig on murine graft-versus-host disease (GVHD) development: CTLA4Ig prevents both acute and chronic GVHD development but reverses only chronic GVHD. *J.Immunol.* 1996;157:4258-4267.
392. Blazar BR, Taylor PA, Gray GS, Vallera DA. The role of T cell subsets in regulating the in vivo efficacy of CTLA4-Ig in preventing graft-versus-host disease in recipients of fully MHC or multiple minor histocompatibility-disparate donor inocula. *Transplantation* 1994;58:1422-1426.
393. Ellis CN, Krueger GG. Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl.J Med.* 2001;345:248-255.
394. Toor AA, Stiff PJ, Nickoloff BJ et al. Alefacept in corticosteroid refractory graft versus host disease: early results indicate promising activity. *J Dermatolog.Treat.* 2007;18:13-18.
395. Shapira MY, Abdul-Hai A, Resnick IB et al. Alefacept treatment for refractory chronic extensive GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:339-343.

396. Ghosh P, Buchholz MA, Yano S, Taub D, Longo DL. Effect of rapamycin on the cyclosporin A-resistant CD28-mediated costimulatory pathway. *Blood* 2002;99:4517-4524.
397. Ma A, Qi S, Wang Z et al. Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice. *Int.Immunopharmacol.* 2009;9:553-563.
398. Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M et al. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005;80:110-117.
399. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743-4748.
400. Palmer JM, Chen BJ, DeOliveira D, Le ND, Chao NJ. Novel mechanism of rapamycin in GVHD: increase in interstitial regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:379-384.
401. Alyea EP, Li S, Kim HT et al. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in related and unrelated donor reduced-intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:920-926.
402. Benito AI, Furlong T, Martin PJ et al. Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 2001;72:1924-1929.
403. Couriel DR, Saliba R, Escalon MP et al. Sirolimus in combination with tacrolimus and corticosteroids for the treatment of resistant chronic graft-versus-host disease. *Br.J Haematol.* 2005;130:409-417.
404. Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood* 2009;114:4919-4927.
405. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG et al. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol* 2007;123:66-73.
406. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 2008;112:1147-1150.

407. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol* 2007;122:62-74.
408. Pillemer BB, Qi Z, Melgert B et al. STAT6 activation confers upon T helper cells resistance to suppression by regulatory T cells. *J.Immunol.* 2009;183:155-163.
409. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat.Immunol.* 2008;9:1347-1355.
410. Feuchtenberger M, Muller S, Roll P et al. Frequency of Regulatory T Cells is Not Affected by Transient B Cell Depletion Using Anti-CD20 Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Open.Rheumatol.J* 2008;2:81-88.
411. Choi S, Reddy P. HDAC inhibition and graft versus host disease. *Mol.Med.* 2011;17:404-416.
412. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat.Med.* 2007;13:1299-1307.
413. Reddy P, Sun Y, Toubai T et al. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J.Clin.Invest* 2008;118:2562-2573.
414. Duramad O, Laysang A, Li J, Ishii Y, Namikawa R. Pharmacologic expansion of donor-derived, naturally occurring CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells reduces acute graft-versus-host disease lethality without abrogating the graft-versus-leukemia effect in murine models. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1154-1168.
415. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
416. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp.Hematol* 2008;36:309-318.
417. Ge W, Jiang J, Arp J et al. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 2010;90:1312-1320.
418. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 2007;69:1-9.

419. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat.Rev.Immunol* 2008
420. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp.Hematol* 2005;33:928-934.
421. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
422. Ren G, Zhang L, Zhao X et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008;2:141-150.
423. Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol.Ther.* 2012;20:187-195.
424. Yin F, Battiwalla M, Ito S et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells to treat tissue damage in allogeneic stem cell transplant recipients: Correlation of biological markers with clinical responses. *Stem Cells* 2014
425. Fokam P, Roy D. PDT : concepts, mécanismes d'action et application en greffe de cellules souches. *Ann.Biol.Clin.Québec* 2006;43:28-33.
426. Finsen NR. The Red Light Treatment of Small-Pox. *Br.Med.J.* 1895;2:1412-1414.
427. Durazzo TS, Tigelaar RE, Filler R et al. Induction of monocyte-to-dendritic cell maturation by extracorporeal photochemotherapy: Initiation via direct platelet signaling. *Transfus.Apher.Sci.* 2013
428. Lamioni A, Parisi F, Isacchi G et al. The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 2005;79:846-850.
429. Legitimo A, Consolini R, Failli A et al. In vitro treatment of monocytes with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light induces dendritic cells with a tolerogenic phenotype. *Clin.Exp.Immunol.* 2007;148:564-572.
430. Baier, J, Pindl, K, and Maier, M. Investigation of the physical principles of the generation of singlet oxygen (1g) during the photodynamic therapy of tumors and other skin diseases. 1-29-2002.

Ref Type: Slide

431. Singh TP, Schon MP, Wallbrecht K et al. 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. *J.Immunol.* 2010;184:7257-7267.
432. Di B, I, Di Maio L, Bugarin C et al. Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* 2009;87:1422-1425.
433. Podgorny PJ, Liu Y, Dharmani-Khan P et al. Immune Cell Subset Counts Associated with Graft-versus-Host Disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2014;20:450-462.
434. Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* 2002;100:375-382.
435. Mielke S, McIver ZA, Shenoy A et al. Selectively T cell-depleted allografts from HLA-matched sibling donors followed by low-dose posttransplantation immunosuppression to improve transplantation outcome in patients with hematologic malignancies. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1855-1861.
436. Solomon SR, Mielke S, Savani BN et al. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* 2005;106:1123-1129.
437. Mielke S, Rezvani K, Savani BN et al. Reconstitution of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) after CD25-depleted allotransplantation in elderly patients and association with acute graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:1689-1697.
438. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
439. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406-414.
440. Pidala J, Anasetti C, Jim H. Quality of life after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2009;114:7-19.
441. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood* 2009;114:3956-3959.

442. Sabry W, Le BR, Labbe AC et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with tacrolimus and mycophenolate mofetil in HLA-matched nonmyeloablative transplant recipients is associated with very low incidence of GVHD and nonrelapse mortality. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2009;15:919-929.
443. Cutler C, Miklos D, Kim HT et al. Rituximab for steroid-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2006;108:756-762.
444. Couriel DR, Hosing C, Saliba R et al. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood* 2006;107:3074-3080.
445. Flowers ME, Apperley JF, van BK et al. A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2008;112:2667-2674.
446. Gatz E, Rogers CE, Clouthier SG et al. Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood* 2008;112:1515-1521.
447. Boumedine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy.* 2005;7:134-143.
448. Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* 2002;100:375-382.
449. Mielke S, Nunes R, Rezvani K et al. A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood* 2008;111:4392-4402.
450. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002;99:3083-3088.
451. Roy DC, Lachance S, Kiss T et al. Haploidentical Stem Cell Transplantation: High Doses of Alloreactive-T Cell Depleted Donor Lymphocytes Administered Post-Transplant Decrease Infections and Improve Survival without Causing Severe Gvhd [abstract]. *Blood* 2009;114:212.
452. Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-2911.

453. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat.Med.* 2003;9:1144-1150.
454. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006;108:1291-1297.
455. Mielke S, Rezvani K, Savani BN et al. Reconstitution of FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) after CD25-depleted allotransplantation in elderly patients and association with acute graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:1689-1697.
456. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2008;111:945-953.
457. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:945-956.
458. Parkman R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease. I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol* 1986;136:3543-3548.
459. Zhang Y, Hexner E, Frank D, Emerson SG. CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 2007;179:3305-3314.
460. Radojcic V, Pletneva MA, Yen HR et al. STAT3 signaling in CD4+ T cells is critical for the pathogenesis of chronic sclerodermatous graft-versus-host disease in a murine model. *J.Immunol.* 2010;184:764-774.
461. Allan SE, Broady R, Gregori S et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev.* 2008;223:391-421.
462. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int.Immunol* 2004;16:1769-1780.
463. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 1995;270:985-988.
464. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3:541-547.

465. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur.J Immunol* 2007;37:129-138.
466. Biagi E, Di B, I, Leoni V et al. Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation* 2007;84:31-39.
467. Di B, I, Di Maio L, Bugarin C et al. Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* 2009;87:1422-1425.
468. Jonson CO, Pihl M, Nyholm C et al. Regulatory T cell-associated activity in photopheresis-induced immune tolerance in recent onset type 1 diabetes children. *Clin Exp.Immunol* 2008;153:174-181.
469. Maeda A, Schwarz A, Bullinger A et al. Experimental extracorporeal photopheresis inhibits the sensitization and effector phases of contact hypersensitivity via two mechanisms: generation of IL-10 and induction of regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181:5956-5962.
470. George JF, Gooden CW, Guo L, Kirklin JK. Role for CD4(+)CD25(+) T cells in inhibition of graft rejection by extracorporeal photopheresis. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27:616-622.
471. Hara M, Kingsley CI, Niimi M et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001;166:3789-3796.
472. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007;26:579-591.
473. Manzotti CN, Tipping H, Perry LC et al. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur.J Immunol* 2002;32:2888-2896.
474. Read S, Greenwald R, Izcue A et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* 2006;177:4376-4383.
475. Andersson J, Tran DQ, Pesu M et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp.Med.* 2008;205:1975-1981.

476. Kullberg MC, Hay V, Cheever AW et al. TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur.J Immunol* 2005;35:2886-2895.
477. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ et al. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J Immunol* 2004;34:2996-3005.
478. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;322:271-275.
479. Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc.Biol.* 2007;81:161-167.
480. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp.Med.* 2002;196:247-253.
481. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006;212:28-50.
482. Dulude G, Roy DC, Perreault C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp.Med.* 1999;189:1329-1342.
483. Poulin JF, Sylvestre M, Champagne P et al. Evidence for adequate thymic function but impaired naive T-cell survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2003;102:4600-4607.
484. Zhang H, Chua KS, Guimond M et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Med.* 2005;11:1238-1243.
485. Bosco N, Agenes F, Rolink AG, Ceredig R. Peripheral T cell lymphopenia and concomitant enrichment in naturally arising regulatory T cells: the case of the pre-Talpha gene-deleted mouse. *J Immunol* 2006;177:5014-5023.
486. Blais ME, Brochu S, Giroux M et al. Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J Immunol* 2008;180:2299-2312.
487. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 2006;177:192-200.
488. Sakaguchi S, Powrie F, Ransohoff RM. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat.Med.* 2012;18:54-58.

489. Dander E, Balduzzi A, Zappa G et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2009;88:1261-1272.
490. Bremm M, Huenecke S, Lehrnbecher T et al. Advanced flowcytometric analysis of regulatory T cells: CD127 downregulation early post stem cell transplantation and altered Treg/CD3(+)CD4(+)-ratio in severe GvHD or relapse. *J.Immunol.Methods* 2011;373:36-44.
491. Bastien JP, Krosi G, Therien C et al. Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2010;116:4859-4869.
492. Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltsis-Mortari A et al. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 2009;114:5062-5070.
493. Lee SM, Lee YS, Choi JH et al. Tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid selectively induces activated T cell death via intracellular GSH depletion. *Immunol.Lett.* 2010;132:53-60.
494. Reddy P, Sun Y, Toubai T et al. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J.Clin.Invest* 2008;118:2562-2573.
495. Rosenblatt J, Bissonnette A, Ahmad R et al. Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1463-1468.
496. Rajasekar R, Mathews V, Lakshmi KM et al. Plasmacytoid dendritic cell count on day 28 in HLA-matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplant predicts the incidence of acute and chronic GVHD. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2008;14:344-350.
497. Ratajczak P, Janin A, Peffault de LR et al. IDO in human gut graft-versus-host disease. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2012;18:150-155.
498. Sato N, Saga Y, Mizukami H et al. Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol.Rep.* 2012
499. Balachandran VP, Cavnar MJ, Zeng S et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat.Med.* 2011;17:1094-1100.

500. Miwa N, Hayakawa S, Miyazaki S et al. IDO expression on decidual and peripheral blood dendritic cells and monocytes/macrophages after treatment with CTLA-4 or interferon-gamma increase in normal pregnancy but decrease in spontaneous abortion. *Mol.Hum.Reprod.* 2005;11:865-870.
501. Mellor AL, Baban B, Chandler PR et al. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J.Immunol.* 2005;175:5601-5605.
502. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2005;11:945-956.
503. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death.Differ.* 2004;11:381-389.
504. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 2009;254:149-154.
505. Klassen J. The role of photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease. *Curr.Oncol.* 2010;17:55-58.
506. Banovic T, MacDonald KP, Morris ES et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005;106:2206-2214.
507. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;105:1162-1169.
508. Pallandre JR, Brillard E, Crehange G et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* 2007;179:7593-7604.
509. Shi Q, Niu Y, Cao H et al. CD28 superagonist antibody treatment attenuated obliterative bronchiolitis in rat allo-orthotopic tracheal transplantation by preferentially expanding Foxp3-expressing regulatory T cells. *Transplant.Proc.* 2012;44:1060-1066.
510. Wang Y, Gong H, Lopez R et al. Correlation between serum serotonin and endoscopy inflammation scores in patients with ileal pouches. *J.Crohns.Colitis.* 2012

511. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Duvignaud JB, Leclerc D, Lapointe R. IDO expression by human B lymphocytes in response to T lymphocyte stimuli and TLR engagement is biologically inactive. *Mol.Immunol.* 2011;49:253-259.
512. Hasseus B, Jontell M, Brune M, Johansson P, Dahlgren UI. Langerhans cells and T cells in oral graft versus host disease and oral lichen planus. *Scand.J.Immunol.* 2001;54:516-524.
513. Linsley PS, Greene JL, Brady W et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity.* 1994;1:793-801.
514. Sharma MD, Huang L, Choi JH et al. An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity.* 2013;38:998-1012.
515. Holtick U, Wang XN, Marshall SR et al. Immature DC isolated after co-culture with PUVA-treated peripheral blood mononuclear cells downregulate graft-versus-host reactions in the human skin explant model. *Curr.Stem Cell Res.Ther.* 2013;8:324-332.

Annexe

Selective T cell depletion for Haplotype mismatched allogeneic stem cell transplantation

Jean-Philippe Bastien, Jean Roy and Denis Claude Roy

Division of Hematology and Stem cell transplantation,
Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center
Department of Medicine, Université de Montréal, Canada

Running title: Selective T cell allodepletion for haplo-transplantation

Word count - Total text: 3671 words; abstract: 216 words

Supported by a grant from the FRQS-TheCell Network and the Canadian Stem Cell Network.

Correspondence to: Denis Claude Roy, MD
Department of Hematology-Stem cell transplantation
Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center
5415 L'Assomption Blvd.
Montreal, QC, H1T 2M4, Canada
Tel.: (514) 252-3404
Fax: (514) 252-3430

- **Paru dans Seminars of oncology, 2012, Décembre; (39)6;p674-82**
- Permission d'utilisation pour cette thèse accordée par le groupe Elsevier.
Numéro de liscence : 3365361361653

- **ABSTRACT**

Haplotype mismatched transplantation offers a unique opportunity to treat patients without a suitable matched related or unrelated donor. Indeed, related haplo-donors are usually extremely motivated, immediately available, and can provide additional stem or immune cells when required, a most important feature in the context of high risk malignancies. Immunomagnetically selected CD34+ stem cell grafts enable rapid and sustained trilineage engraftment. However, the associated delay in immune reconstitution results in significant risk for severe infectious complications and malignant relapse. The infusion of T lymphocytes selectively depleted of their anti-host reactive components represents the most interesting approach to accelerate post-transplant T cell recovery. Such a strategy relies on ex vivo donor cell activation against host antigens and their selective elimination. Immunotoxins and magnetic beads could target antigens such as CD25 with impressive results. Photodepletion of alloreactive T cells represents an appealing alternative to both eliminate anti-host immune T cells and spare memory T cells to fight infections. Interestingly, regulatory T cells can be retained after such treatment, and have been found to transform non-regulatory into regulatory T cells, a finding that may be of utmost importance in both prevention and control of GVHD. Efforts to promote efficient antigen presentation and selective allodepletion promise to accelerate immune reconstitution without GVHD and to address the most crucial issues in haplo-mismatched and other types of transplants.

Finding the appropriate donor

Aggressive therapeutic modalities using high doses of chemotherapy and/or radiation therapy are now commonplace treatments for leukemia, lymphoma and various non hematologic malignancies. These intensive approaches have often been used in association with hematopoietic stem and progenitor cell support and have led to major responses and remissions in patients with relapsed or refractory diseases, ultimately contributing to improve the disease-free-survival of patients with high risk hematologic malignancies¹.

On the other hand, only a small percentage of patients (20-25%) can hope to find a histocompatible family donor in order to undergo high dose chemotherapy and/or radiation. For these patients, unrelated donors from world registries are sought. Such searches are accompanied by quite variable successes depending on ethnicity and availability of donors of different origins. Indeed, we are learning that individuals across the globe may have distinct immunologic behaviors in comparison to others, and that HLA types from some ethnic backgrounds are poorly represented in such registries^{2;3}. Two other options are also offered to those individuals who cannot find a matched related donor: umbilical cord transplantation and haplotype mismatched related transplants^{4;5}.

Umbilical cord transplants are usually easily accessible, with improved definition of collection parameters and characterization of cell products over time⁶. Cells present in these grafts enable transplant of cells presenting variable levels of mismatching with the patient. Indeed the low incidence of graft-versus-host disease (GVHD) permits low stringency HLA matching. However, the number of cells that can be collected from such grafts is limited and poses a particular problem for transplantation of adult patients. Interestingly, transplantation of 2 or more cords affords stem cell engraftment in adults or adolescents of adult weight^{7;8}. Nevertheless, neutrophil and platelet engraftment remains delayed and the subject of intensive investigation to shorten the duration of this high risk interval. In addition, transplantation of a rather immature immune system is accompanied by an increased incidence of infections, particularly of viral origin.

Haplo-identical related donors offer an appealing transplant alternative to those who do not have a readily available donor. Indeed, parents and children can be used as donors, as well as haplotype-matched siblings. Even more distant family members such as cousins and uncles/aunts can present adequate matching to enable transplantation. Importantly, such donors are immediately available and usually highly motivated. Results to date demonstrate that this type of transplant presents a number of advantages as it can be achieved with relatively low morbidity⁴. This approach also provides constant access to the donor in the rare instances where graft rejection would occur. In addition, donor lymphocyte infusions could be administered to fight infections or leukemia relapse.

T-cell depletion in haplo-transplantation

Initial attempts at haplo-transplantation have been associated with a high incidence of acute GVHD.⁹ In addition, engraftment failure, both early and late, affected more than 10% of transplant patients, representing a major obstacle to haplo-transplantation.¹⁰ Long-term survival below 10% were initially observed after 2-loci mismatched transplantation in standard and high risk patients.¹¹ Such findings prompted the development of ex vivo T cell depletion strategies to decrease the incidence of GVHD, albeit long term outcome remained low.¹²

Identification by Reisner et al that CD34+ cells harbored a veto effect and prevented donor graft rejection by residual host T cells surviving the preparative regimen represented a major advance.¹³ This finding, in addition to the development of immunomagnetic cell selection devices affording high CD34+ stem cell recovery with high levels of purity in a reliable and reproducible fashion, created unique conditions for the performance of haplo-transplantation. Indeed, Aversa et al could perform haplo-transplantation using positively selected CD34+ stem cells without problems with engraftment or GVHD.¹⁴ Patients administered CD34+ cells grafts with minimal contamination by donor T cells (less than 2×10^4 CD3+ cells/kg) did not experience significant GVHD. Interestingly, lethal GVHD was observed in individuals receiving as few as 3×10^4 CD3+ cells/kg. In a phase II clinical

study, the Perugia group reported T-depleted haplo-identical transplantation on 67 patients with high risk AML and 37 patients with ALL. GVHD rates were very low (8% grade II-IV acute GVHD and 3% extensive chronic GVHD).¹⁵ However, they reported a 40% transplantation related mortality, mostly from infection and high relapse rates, an observation pointing toward a lack in cognate immunity. The role of T cells may be even more important when the intensity of the preparative regimen is decreased. Indeed, 11 patients were transplanted using a modified Perugia regimen without total body irradiation in a Canadian multicenter study. They reported no GVHD, however, 10 of the 11 patient died within 4 months of relapse or infections.¹⁶ Importantly, decreased relapse rates were observed in individuals demonstrating killer inhibitory receptors (KIR).¹⁵ Acute myeloid leukemia cells were found to be particularly sensitive to donor natural killer (NK) cells with KIR-mismatching against the host. Nevertheless, viral and fungal infections remained a significant concern and a major cause of mortality after such T cell depleted transplantation.¹⁶⁻¹⁸ A recent study by Cho et al compared the impact of in vivo T cell depletion using anti-thymocyte globulin (ATG) in haplo-identical transplantation and matched donor in the context of reduced intensity regimen.¹⁹ They observed that ATG administration was associated with greater CMV infection rates in haplo-identical compared to matched transplants. However, no differences were found in the overall survival, relapse, GVHD and disease-free survival rates.¹⁹ In addition, many studies also reported that the profound T cell depletion produced by ATG administration was associated with increased risks of serious infections.²⁰⁻²² Similar results were observed in a multi center study by Ciceri et al where low levels of GVHD were observed following ex vivo T-depleted haplo-identical transplantation, but with high mortality rates due to infections.²³

CD3/CD19 immunomagnetic depletion of cell grafts is also being investigated in an effort to reduce GVHD incidence while preserving NK and gamma-delta T cells.²⁴ Very encouraging results in pediatric populations were observed, with faster immune recovery and high NK cell numbers resulting in fewer graft rejections, relapses and infectious episodes.²⁵ In contrast, adult patients demonstrated surprisingly high grade II-IV acute

GVHD rates.^{26;27} This could be explained by the loss of thymic function in adults which could protect against lymphopenia and GVHD. Taken together, these results show that ex vivo T cell depletion is feasible in the context of haplo-identical mismatched transplantation, but at the cost of higher infection and relapse rates.

In vivo depletion of alloreactive cells

As an alternative to ex vivo depletion of graft T cells, a few groups in Philadelphia and Baltimore are studying an in vivo approach where endogenously activated T cells are killed using post-transplant chemotherapy (discussed in the present issue of Seminars in Oncology). Patients receiving T replete grafts were exposed to high dose cyclophosphamide post-transplant which resulted in reduced levels of GVHD, accounting for only 3% of total deaths. These studies were very encouraging with only 15% non relapse mortality.^{28;29} However, subsequent evaluations showing a 2-year relapse rate close to 60% raised the possibility that such treatment might have eliminated cells mediating graft-versus-leukemia activity.³⁰ Another approach consists in the infusion of low doses of T cells in the patient followed by cyclophosphamide for T cell tolerization. This is followed by the administration of a CD34+ selected graft to prevent cytopenias. This 2-step approach was well tolerated, with low incidences of severe GVHD, relapse and infection rates.³¹ Such options clearly warrant long term evaluations.

Selective ex vivo T cell allodepletion

While acute myeloid leukemia cells may be targeted by NK cells, infectious agents, particularly viruses and fungi, usually require T cell intervention. Attempts to accelerate immune reconstitution after T cell depletion have been accompanied by GVHD and could not be implemented. In this setting, there was a clear need for administration of T cells that could recognize infectious and leukemia antigens, but not host cells. Toward this goal, groups led by Cavazzana-Calvo, Champlin and Barrett et al developed a strategy depending on the elimination of donor cells with the ability to recognize host antigens in vitro³²⁻³⁵. For

this purpose, donor peripheral blood mononuclear cells are incubated with those of the recipient in a mixed lymphocyte reaction. T lymphocytes recognizing the major histocompatibility complex (MHC) antigen of the host become activated and express the interleukin-2 receptor (CD25). Activated cells were then eliminated using anti-CD25 monoclonal antibody targeting with toxin or magnetic beads.^{32,33} Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin did not impair in vitro antileukemia and antiviral activity.³² Indeed, this ricin A chain immunoconjugate depleted alloreactive T cells and preserved cells with the ability to kill autologous CMV-infected fibroblasts as well as autologous EBV-B-lymphoblastoid cell lines.³² The same CD25 antigen could also be targeted using immunomagnetic beads to eliminate alloreactive T cells.³³ Such results are supported by anti-CD25 in vivo usage for GVHD prophylaxis and treatment.³⁶⁻³⁸

When these laboratory findings were translated into a pediatric population, anti-CD25-immunotoxin (FRT5-dgA) treatment of MLR activated cells resulted in the elimination of 95-100% of anti-host reactivity. Immune responses post allodepletion could be observed in 12 of the 16 grafts, yet no GVHD of grade III or more were observed. Interestingly GVHD was only observed in patients with grafts demonstrating more than 1% residual alloproliferation.³⁹ In 3 patients developing cytomegalovirus infection, virus-specific T cells expanded rapidly, a finding only observed in the setting of the infusion of allodepleted lymphocytes. Such a strategy was also used in the context of matched sibling transplantation in an adult population and allowed to limit GVHD prophylaxis to cyclosporine and selectively depleted T cells (10^8 T cells/kg).³⁴ Immune reconstitution was rapid and grade III to IV acute GVHD was only observed in 12% of patients. This anti-CD25 immutoxin was also tested in a primarily pediatric haplo-transplant population and found to induce anti-CMV and anti-EBV responses in 4 of 6 patients treated with 10^5 T cells /kg.³⁵ The fact that few patients developed acute or chronic GVHD supports the concept of T cell allodepletion using a mixed lymphocyte reaction (MLR) to identify donor cells with the ability to recognize patient cells. However there are a number of issues with

targeting of CD25 to eliminate cells with GVHD potential. Indeed, CD25 is expressed only transiently upon exposure to mismatched cells. In addition, CD25 is also expressed on the surface of regulatory T cells, a subset of cells which may be of particular interest in preventing GVHD in the context of highly immunogenic HLA-mismatched transplantation.

Photodepletion of alloreactive T cells

In order to obviate the need for CD25 targeting, we have been working on a photodynamic approach for the selective destruction of alloreactive T cells, while preserving immunologic cells with non-pathogenic residual activity but anti-infection and anti-leukemia activity. Photodynamic therapy is currently used in many different indications, particularly in cancer treatment.⁴⁰ It is based on the observation that some compounds are not cytotoxic on their own, but become highly toxic to cells upon illumination with light of a suitable wavelength. Most often this is a result of the generation of reactive oxygen species by these compounds upon illumination. In a preclinical model, L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLME) was shown to deplete dipeptidyl peptidase I (DPPI)-expressing cytotoxic cellular subsets.⁴¹ This could be translated into a dose dependent increase of survival in mice without affecting the GVL effect⁴¹ nor the T cell repertoire.⁴² Most photodynamic compounds do not, however, show high cell type specificity. We have developed a photodepletion approach using a highly potent dibromorhodamine photosensitizing compound, TH9402, which selectively accumulates in cancer cells and alloreactive T cells and can be activated by visible light (514 nm). The illumination device incorporates a light source with two fluorescent tubes and an acrylic filter that eliminates ultraviolet light and provides an output spectrum similar to the absorption spectrum of TH9402. Preclinical studies have demonstrated that this compound eliminates malignant cells highly efficiently, but is not toxic to hematopoietic stem cells.⁴³ In addition, Guimond et al have shown that T cell activation results in functional P-glycoprotein 170 inhibition with ensuing intracellular trapping of TH9402.⁴⁴ Thus, dibromorhodamine accumulation results, upon light exposure, in the formation of a triplet excited state from a singlet excited state,⁴⁵ leading to lethal cell damage, both of apoptotic and necrotic origin⁴⁶.

Upon exposure to host mononuclear cells demonstrating allogeneic MHC-mismatched antigens, allostimulated donor CD4⁺ and CD8⁺ cells retained TH9402 preferentially over their resting counterparts. This treatment caused selective elimination of immunoreactive T-cells, as measured using flow cytometry, proliferation assays and cytotoxic T cell precursor frequencies. Importantly, residual T cells had the ability to respond to third party cells. In addition, P-glycoprotein inhibition with verapamil or cyclosporine A promoted intracellular trapping of the photosensitizer and global cell elimination, underlining the role of P-glycoprotein in this process. When tested using murine cells, this strategy eliminated anti-host responses but preserved responses against a syngeneic BCL1 leukemia/lymphoma and third party cells. In addition, the administration of selectively depleted T cells in vivo not only prevented the development of acute GVHD in a mismatched setting, but also allowed recipients to survive without detectable leukemia cells.⁴⁷

When tested in a clinical trial in an HLA- matched setting, CD4⁺ naïve and central memory T cells were eliminated after photodynamic processing while CD8⁺ naïve and effector cells were preserved.⁴⁸ Patients receiving photodepleted cells demonstrated complete donor chimerism rapidly and reconstituted with enhanced CD8⁺ naïve cells. However, these patients demonstrated infectious complications and chronic GVHD. While this study reported relatively low relapse rates, it emphasizes the difficulty of selectively eradicating donor cells reacting toward minor histocompatibility antigens from fully matched HLA-compatible donors. In comparison, photodepletion of haplotype mismatched cells activated in a mixed lymphocyte reaction preserved naïve and central memory cells of both CD4⁺ and CD8⁺ origins⁴⁴. In addition, when administered to patients, the naïve CD4⁺ and CD8⁺ compartments also demonstrated the most prominent recovery. These different cell graft and immune recovery results highlight the striking differences in cell behaviour between HLA-matched and –mismatched cells. In addition, T cells were selected as stimulator cells in the HLA-matched donor setting to minimize the possibility of activating cells against occult malignant residual cells.⁴⁸ The fact that antigen presenting cells consisted of T cells, which harbor less immunogenic potential than conventional antigen presenting cells, and

underwent CD3⁺ selection and expansion prior to their use, as well as the relatively short immunization period and lack of cytokine support during the co-culture with donor cells, may all have contributed to the relative deficiency in anti-host cell elimination⁴⁹. Indeed, Mielke et al, from the same laboratory, was able to generate specific depletion of anti-host reactivity in the context of haplotype mismatch between donor and recipient.⁵⁰ Moreover, a preclinical study demonstrated that TH9402 photodepleted cells could be used in conditions resulting in the elimination of anti-host response, and induction of specific responses to pathogens such as cytomegalovirus, adenovirus, varicella zoster virus, herpes simplex virus, aspergillus fumigatus, Candida albicans and Toxoplasma gondii.^{51;52}

Haplo-identical stem cell transplantation with photodepleted T cell add-back

As previously discussed, there is a need for rapid immune response toward infectious agents when using T cell depleted haplo-identical grafts. To address this major obstacle, we investigated the ability of donor lymphocyte infusions photodepleted of their alloreactive component to accelerate post-transplant immune reconstitution. A clinical phase I trial was performed in adults to evaluate selective elimination of host-reactive T cells for prevention of GVHD using the dibromorhodamine-based photodepletion approach described above⁵³

Of the 27 adult patients enrolled, 19 patients (median age of 54 years) presenting very high risk hematologic malignancies (mostly refractory or relapsed acute leukemias (n=11) or myelodysplastic syndromes (n=4)) were transplanted. The preparative regimen consisted of total body irradiation, thiotepa and fludarabine and was followed by CD34⁺ immunomagnetically selected peripheral blood cell grafts. One month later, patients received incremental doses of an add-back of photodepleted T-lymphocytes to accelerate immune reconstitution (ATIR). Doses of ATIR cells ranged from 1×10^4 (level I) to 5×10^6 (level VII) CD3⁺ cells/kg. The high level of elimination of alloreactive T cells observed in preclinical studies, as measured using flow cytometry and cytotoxic T lymphocyte precursors, could be replicated in the clinical trial. Although none of the patients received GVHD prophylaxis, no patient developed grade III-IV acute GVHD. Grade II acute GVHD

developed in only 4 patients, with 3 of these corresponding to the 2 highest T cell doses. Immunologic recovery was first observed in NK (CD56+) followed by B (CD19+) cells within the first weeks post-transplant. Patients who had received the highest T-cell doses were the first ones to present with CD3+, CD4+ and CD8+ cells. When compared to patients receiving low doses of photodepleted T cells, patients receiving high cell doses ($\geq 3 \times 10^5$ T cells/kg) had decreased infections and delayed in the time to develop their first infection. Interestingly, the difference in T cell dose translated in a low treatment-related mortality in the latter group. This treatment strategy resulted in an overall survival of $47.4 \pm 22.4\%$ ($\pm 95\%$ confidence interval) and event-free-survival of $36.8 \pm 21.7\%$ at 2 years, with a median follow-up of 4.0 years, an impressive finding in view of the particularly poor prognosis of these patients. Transplant-related mortality was decreased in the high (19.2%) versus the low (65.7%) T-cell dose group, with a similar trend for improved survival in the high T-cell dose group. These results indicate that it is possible to administer T cells with the ability to recognize and fight infections without inducing severe GVHD. The benefits of this alloreactive T cell photodepletion are particularly promising for patients undergoing haplo-transplantation, where infections represent the most important cause of treatment failure. These results are currently further investigated in a phase II trial.

Generation of potent and specific anti-host alloreactivity

Successful depletion of T cells with anti-host reactivity relies on the ability of immunization protocols to elicit specific anti-host responses and on the efficacy of treatment procedure utilized to eradicate these activated cells. MLR is currently the easiest and most efficient strategy to prime donor against patient cells. However, cells cultured in a MLR increase their CD25 expression, particularly in the CD4+ subset, while few CD8+ cells do so³³. This may reflect the propensity of class II MHC antigens to generate MLR-reactive cells while class I antigens usually require a stronger stimulus. For this reason, we have incorporated cytokine support in the form of interleukin-2, which resulted in consistent cell activation across both MHC subtypes. Utilization of purified dendritic cells and other professional antigen presenting cells could also increase immunization

potential^{54;55}. In addition, high resolution sequencing may foster the identification of tissue antigens that elicit the strongest GVHD responses, thus leading to specific T cell activation against crucial GVHD epitopes⁵⁶. Better definition of priming conditions with the ability to consistently activate cells against minor histocompatibility antigens would open the door to perform MHC-matched transplants without additional immunosuppression.

Regulatory T cell preservation and enhancement

While cytokines like interleukin-2 can increase alloreactivity and enhance the elimination of anti-host reactive cells, Guimond et al found that a small CD4+CD25+ T cell population was resistant to the above TH9402 phototherapy and could represent regulatory T cells.⁴⁴ In a clinical scaling study, Mielke et al identified those resistant CD4+CD25+ cells as FOXP3+, a finding that provides further support to the regulatory nature of these cells.⁵⁷ Moreover, Bastien et al demonstrated that TH9402 eliminated endogenously activated T cells from GVHD patients while preserving functional regulatory T cells, a strategy that could be useful for the treatment of chronic GVHD.⁵⁸ Indeed, extracorporeal photopheresis consists in the phototreatment of lymphopheresis cells collected from GVHD patients. Most current studies involve 8-methoxypsoralen (8-MOP) to eliminate T cells and attenuate GVHD symptoms primarily through an IL-10 dependent mechanism.⁵⁹ We showed that TH9402 could preserve regulatory T cells that inhibit alloreactivity through IL-10 secretion and CTLA-4 ligation.⁵⁸ In addition, photodepleted cells could induce a regulatory T cell phenotype within CD4+CD25- cells in a CTLA-4 dependent mechanism.⁵⁸ Moreover, when TH9402 photodepleted patient cells were reinjected to these chronic GVHD patients on a weekly schedule, an increase in regulatory T cells was observed in the peripheral blood as early as 2 weeks after the first injection.⁵⁸ In contrast, such a regulatory T cell increase required 3 months of treatment with 8-MOP.⁶⁰ Interestingly, photodepletion with TH9402 was found to be particularly efficient at inducing selective depletion of host reactive T cells from GVHD patient cells compared to CD25+ depletion (Figure 1). Thus

the same photoactive agent could be used for both prevention and treatment of GVHD. Furthermore, TH9402 also induces an anti-inflammatory phenotype in dendritic cells allowing further inhibition of GVHD response.⁶¹ Hence, by its activity on activated cells, concomitant preservation of Tregs and effect on dendritic cells, TH9402 may not only be appropriate for the prevention of GVHD in haplo-identical transplantation, but also part of an effective strategy for the treatment of established GVHD.

Conclusions

Concomitant achievements in laboratory strategies, technological developments and clinical applications have resulted in major advances in the performance of haplo-mismatched transplantation. The infusion of high doses of CD34+ selected grafts afforded engraftment without GVHD. However, impaired T cell reconstitution was associated with an increased incidence of infections and malignant relapse. Selective depletion of alloreactive T cells enables the administration of T cells with the ability to fight infections and malignancy without causing GVHD. T cell photodepletion represents a particularly appealing approach for selective allodepletion as it eliminates anti-host reactive cells and preserves resting cells with anti-infection and potentially anti-leukemia activity. Moreover, treatment conditions can be modified to enhance the presence of regulatory T cells and position these cells as prime immunomodulators in the context of GVHD treatment.

Development of increasingly effective ex vivo immunizing strategies using dendritic and other antigen presenting cells, enhanced culture conditions, and potent and selective depletion strategies may be of utmost importance in the control of GVHD for haplotype mismatched and other transplants. Such combined efforts should increase patient access to safer haplotype mismatched transplantation and improve patient outcome significantly.

Figure Legend:

Figure 1: Anti-CD25 versus TH9402 depletion of CD25+ alloreactive and regulatory T cells. A) When donor T cells are exposed to recipient mononuclear cells, host reactive T conventional (Tcon) become activated and acquire CD25 and other antigens share between activated and regulatory T cells. B) Anti CD25 monoclonal antibodies interact with both activated Tcon and regulatory T cells (Tregs), leading to magnetic depletion of both cellular subsets. C) The photosensitizer TH9402 is predominantly retained in activated T cells with low levels of accumulation in regulatory T cells. This allows for selective elimination of activated T cells with minimal regulatory T cell apoptosis and preservation of resting T cells. D and E) Peripheral blood mononuclear cells from GVHD patients either exposed to anti-CD25 immunomagnetic beads or TH9402 photodepletion. Three days later, activated CD4+CD25+FOXP3- T cells undergo massive elimination in both conditions, as measured by flow cytometry. However, CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells are eliminated with CD25 targeting but spared after photodepletion.

References

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-389.
2. Dehn J, Arora M, Spellman S et al. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: factors associated with a better HLA match. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1334-1340.
3. Lown RN, Shaw BE. Beating the odds: factors implicated in the speed and availability of unrelated haematopoietic cell donor provision. *Bone Marrow Transplant.* 2012
4. Barrett J, Gluckman E, Handgretinger R, Madrigal A. Point-counterpoint: haploidentical family donors versus cord blood transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:S89-S93.
5. Ballen KK, Koreth J, Chen YB, Dey BR, Spitzer TR. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* 2012;119:1972-1980.
6. Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin.Hematol.* 2010;47:3-12.

7. Rocha V, Crotta A, Ruggeri A et al. Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2010;23:223-229.
8. Brunstein CG, Eapen M, Ahn KW et al. Reduced intensity conditioning transplantation in acute leukemia: the effect of source of unrelated donor stem cells on outcomes. *Blood* 2012
9. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM et al. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N.Engl.J Med.* 1985;313:765-771.
10. Anasetti C, Amos D, Beatty PG et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N.Engl.J Med.* 1989;320:197-204.
11. Kanda Y, Chiba S, Hirai H et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000). *Blood* 2003;102:1541-1547.
12. Mehta J, Singhal S, Gee AP et al. Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:389-396.
13. Rachamim N, Gan J, Segall H et al. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific

reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998;65:1386-1393.

14. Aversa F, Tabilio A, Velardi A et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N.Engl.J Med.* 1998;339:1186-1193.
15. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295:2097-2100.
16. Walker I, Shehata N, Cantin G et al. Canadian multicenter pilot trial of haploidentical donor transplantation. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;33:222-226.
17. Lang P, Greil J, Bader P et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplantation in children. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;33:281-287.
18. Aversa F. Setting the standard in T-cell-depleted haploidentical transplantation and beyond. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2011;24:325-329.
19. Cho BS, Yoon JH, Shin SH et al. Comparison of Allogeneic Stem Cell Transplantation from Familial-Mismatched/Haploidentical Donors and from Unrelated Donors in Adults with High-Risk Acute Myelogenous Leukemia. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2012

20. Sauter C, Abboud M, Jia X et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1460-1471.
21. Ciurea SO, Saliba R, Rondon G et al. Reduced-intensity conditioning using fludarabine, melphalan and thiotepa for adult patients undergoing haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:429-436.
22. Yu ZP, Ding JH, Wu F et al. Quality of life of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with antihuman thymocyte globulin. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2012;18:593-599.
23. Ciceri F, Labopin M, Aversa F et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood* 2008;112:3574-3581.
24. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P et al. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:777-783.
25. Lang P, Schumm M, Greil J et al. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin.Padiatr.* 2005;217:334-338.

26. Bethge WA, Faul C, Bornhauser M et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: an update. *Blood Cells Mol.Dis.* 2008;40:13-19.
27. Federmann B, Hagele M, Pfeiffer M et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia* 2011;25:121-129.
28. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood* 2001;98:3456-3464.
29. O'Donnell PV, Luznik L, Jones RJ et al. Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2002;8:377-386.
30. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2008;14:641-650.

31. Grosso D, Carabasi M, Filicko-O'Hara J et al. A 2-step approach to myeloablative haploidentical stem cell transplantation: a phase 1/2 trial performed with optimized T-cell dosing. *Blood* 2011;118:4732-4739.
32. Montagna D, Yvon E, Calcaterra V et al. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999;93:3550-3557.
33. Garderet L, Snell V, Przepiorka D et al. Effective depletion of alloreactive lymphocytes from peripheral blood mononuclear cell preparations. *Transplantation* 1999;67:124-130.
34. Solomon SR, Mielke S, Savani BN et al. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood* 2005;106:1123-1129.
35. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797-1808.
36. Anasetti C, Martin PJ, Storb R et al. Prophylaxis of graft-versus-host disease by administration of the murine anti-IL-2 receptor antibody 2A3. *Bone Marrow Transplant.* 1991;7:375-381.

37. Guo M, Sun Z, Sun QY et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2009;15:930-937.
38. Liu J, Wang HX, Duan LN et al. [Efficacy of anti-CD25 monoclonal antibody used in treating steroid-resistant acute graft-versus-host disease following haploidentical bone marrow transplantation]. *Zhongguo Shi Yan.Xue.Ye.Xue.Za Zhi.* 2009;17:160-163.
39. Andre-Schmutz I, Le DF, Hacein-Bey-Abina S et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet* 2002;360:130-137.
40. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2003;3:380-387.
41. Hsieh MH, Varadi G, Flomenberg N, Korngold R. Leucyl-leucine methyl ester-treated haploidentical donor lymphocyte infusions can mediate graft-versus-leukemia activity with minimal graft-versus-host disease risk. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2002;8:303-315.
42. Friedman TM, Filicko-O'Hara J, Mookerjee B et al. T cell repertoire complexity is conserved after LLME treatment of donor lymphocyte infusions. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1439-1447.

43. Boumedine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy*. 2005;7:134-143.
44. Guimond M, Balassy A, Barrette M et al. P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* 2002;100:375-382.
45. Pal P, Zeng H, Durocher G et al. Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem.Photobiol.* 1996;63:161-168.
46. Dai QY, Guerin M, Maldonado AC, Scotto C, Roy DC. Specific antitumor effect of a dendritic cell-based vaccine loaded with photodynamically treated tumor cells [abstract]. *Experimental Hematology* 2006;
47. Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002;99:3083-3088.
48. McIver ZA, Melenhorst JJ, Grim A et al. Immune reconstitution in recipients of photodepleted HLA-identical sibling donor stem cell transplantations: T cell subset frequencies predict outcome. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1846-1854.
49. Ramming A, Thummler K, Schulze-Koops H, Skapenko A. Homotypic T-cell/T-cell interaction induces T-cell activation, proliferation, and differentiation. *Hum.Immunol.* 2009;70:873-881.

50. Mielke S, McIver ZA, Shenoy A et al. Selectively T cell-depleted allografts from HLA-matched sibling donors followed by low-dose posttransplantation immunosuppression to improve transplantation outcome in patients with hematologic malignancies. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1855-1861.
51. Perruccio K, Topini F, Tosti A et al. Optimizing a photoallodepletion protocol for adoptive immunotherapy after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011
52. Perruccio K, Topini F, Tosti A et al. Photodynamic purging of alloreactive T cells for adoptive immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol.Dis.* 2008;40:76-83.
53. Roy DC, Guerin M, Sidi Boumedine R et al. Reduction in Incidence of Severe Infections by Transplantation of High Doses of Haploidentical T Cells Selectively Depleted of Alloreactive Units [abstract]. *Blood* 2011;118:
54. Nussenzweig MC, Steinman RM. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J Exp.Med.* 1980;151:1196-1212.
55. Manzo T, Hess MR, Basso V et al. Concurrent allorecognition has a limited impact on posttransplant vaccination. *J Immunol.* 2011;186:1361-1368.
56. Vincent K, Roy DC, Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* 2011;118:2951-2959.

57. Mielke S, Nunes R, Rezvani K et al. A clinical-scale selective allodepletion approach for the treatment of HLA-mismatched and matched donor-recipient pairs using expanded T lymphocytes as antigen-presenting cells and a TH9402-based photodepletion technique. *Blood* 2008;111:4392-4402.
58. Bastien JP, Krosi G, Therien C et al. Photodepletion differentially affects CD4+ Tregs versus CD4+ effector T cells from patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2010;116:4859-4869.
59. Capitini CM, Davis JP, Larabee SM et al. Extracorporeal photopheresis attenuates murine graft-versus-host disease via bone marrow-derived interleukin-10 and preserves responses to dendritic cell vaccination. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011;17:790-799.
60. Di B, I, Di ML, Bugarin C et al. Regulatory T cells and extracorporeal photochemotherapy: correlation with clinical response and decreased frequency of proinflammatory T cells. *Transplantation* 2009;87:1422-1425.
61. Broady R, Yu J, Levings MK. Pro-tolerogenic effects of photodynamic therapy with TH9402 on dendritic cells. *J Clin.Apher.* 2008;23:82-91.

