

Université de Montréal

**Étude des cellules dendritiques chez les patients qui
ont subi une greffe de cellules souches allogéniques**

Par

Philippe LAFLAMME

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

**Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et
postdoctorales en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc)**

en Microbiologie et Immunologie

Juin 2013

©Philippe Laflamme, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire est intitulé :

**Étude des cellules dendritiques chez les patients qui
ont subi une greffe de cellules souches allogéniques**

Par

Philippe LAFLAMME

Évaluation par un jury des personnes suivantes

Dr.Jean-Sébastien DELISLE,

Président rapporteur

Dr.Martin Guimond,

Directeur de recherche

Dr.Michel Duval,

Membre du jury

Résumé

La vigueur de la réponse immunitaire générée par les cellules dendritiques (DC) a positionné ces cellules comme médiatrices centrales dans l'activation des lymphocytes T. La vulnérabilité des cellules cancéreuses de leucémie myéloïde chronique (LMC) à l'intervention immunitaire résulte apparemment de la capacité des cellules leucémiques de se différencier en DC. Ces DC ont alors la capacité de présenter des peptides provenant des cellules souches leucémiques aux lymphocytes T. Dans ce travail, nous démontrons que la plupart des patients atteints d'une LMC présentent un déficit important en DC au niveau du sang et de la moelle osseuse avant la greffe de cellules souches allogéniques. Les faibles niveaux de DC circulantes résultent en grande partie d'une perte de la diversité au niveau des cellules progénitrices CD34⁺ leucémiques au niveau de la moelle osseuse. Ces cellules progénitrices CD34⁺ présentent d'ailleurs une capacité réduite à se différencier en DC in vitro. Nous avons trouvé qu'un décompte faible de DC avant une greffe allogénique était associé à une diminution significative de la survie et une augmentation considérable du risque de développer une des complications mortelles. Puisque la reconstitution des DC suite à la greffe est absente, notre étude appuie aussi la thèse que ce sont les cellules DC pré greffe qui sont primordiales dans l'effet du greffon contre leucémie (GVL). Dans ce contexte, notre étude suggère que le compte des DC avant la greffe allogénique pourrait servir de marqueur pronostique pour identifier les patients LMC à risque de développer certaines complications suite à une greffe allogénique.

MOTS CLÉS: Leucémie myéloïde chronique, cellules dendritiques, bcr/abl, homéostasie, immunothérapie

Abstract

The intensity of the immune response that is generated by the dendritic cells (DCs) has established these cells as central mediators in the activation of T lymphocytes. The vulnerability of leukemic cells present in chronic myeloid leukemia is mostly attributable to the ability of the leukemic stem cell to differentiate themselves into potent DCs. The latter are then able to present peptides which come from endogenous origin and from leukemic stem cells to the T lymphocytes. In this thesis, we demonstrate that, before allogeneic stem cell transplant, the majority of patients afflicted by CML have a considerable lack of DCs in their peripheral blood as well as in their bone marrow. The low levels of circulating DCs result to a great extent from a loss of diversity in the CD34⁺ leukemic progenitor cells located in the bone marrow. Moreover, these CD34⁺ leukemic progenitor cells display a reduced capacity to differentiate themselves into DCs in vitro. Our findings show that having a low level of DCs prior to an allogeneic transplant is associated with a significant decline in survival rates as well as with increased risks of developing life threatening complications. Since the DCs' reconstitution following an allogeneic bone marrow transplant is missing, our study supports the thesis that pre graft DCs are essential in the Graft versus leukemia effect (GVL). Therefore, our research suggests that tallying DC before proceeding with an allogeneic transplant could act as a prognostic marker to identify LMC patients who present risks of complications after an allogeneic transplant.

KEYWORDS: Chronic myeloid leukemia, dendritic cells, bcr/abl, homeostasis, immunotherapy

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Table des matières	3
Liste des tableaux	6
Table 1: <i>Patients and characteristics</i>	6
Liste des figures	7
Liste des abréviations utilisées.....	8
Remerciements	12
1.Introduction	14
1.1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	15
1.1.1. La greffe de CSH allogénique.....	15
1.1.2. La greffe de CSH autologue	16
1.2. Les sources de CSH et la chimiothérapie.....	17
1.2.1. La moelle osseuse et le sang périphérique.....	17
1.2.2. Le sang de cordon	17
1.2.3. La compatibilité: le système HLA.....	18
1.2.4. Traitement chimiothérapeutique et leucopénie.....	18
1.2.4.1. Le conditionnement myéloablatif.....	19
1.2.4.2. Le conditionnement à intensité réduite.....	19
1.4. La régénération du compartiment lymphocytaire chez l'homme.....	20
1.4.1. La voie thymique	20
1.4.2. La sénescence thymique causée par le vieillissement.....	22
1.4.3. La prolifération homéostatique des cellules T matures	24

1.5. Les complications postgreffe majeures : la rechute et la GVH.....	25
1.5.1. Réaction du greffon contre l'hôte ou GVH.....	25
1.5.1.1. Réaction du greffon contre l'hôte aiguë.....	26
1.5.1.2. Réaction du greffon contre l'hôte chronique.....	28
1.5.2. GVH et GVL: La jonction entre bénéfique et néfaste.....	29
1.5.2.1. L'immunité antitumorale ou effet GVL (greffon versus leucémie).....	29
1.6. Le rôle des cellules dendritiques en greffe de CSH.....	31
1.6.1. Les principales populations de cellules dendritiques.....	31
1.6.1.1. Les cellules dendritiques inflammatoires.....	32
1.6.1.2. Les cellules dendritiques myéloïdes.....	32
1.6.1.3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).....	33
1.6.2. Génération et facteurs de différenciation des DC.....	36
1.6.2.1. GM-CSF, IL-4 et TNF- α	36
1.6.2.2. FLT3-Ligand (FL).....	36
1.6.2.3. IL-3.....	37
1.6.2.4. <i>Monocyte colony stimulating factor</i> (M-CSF).....	38
1.6.3. Mécanismes d'activation des DC.....	38
1.6.3.1. Facteurs solubles importants pour la maturation et l'activation des DC.....	38
1.7. Le rôle des DC dans l'effet GVH.....	39
1.7.1. Les cellules dendritiques de l'hôte et du donneur.....	40
1.7.2. Cellules dendritiques tolérogéniques (tolDC).....	41
1.7.3. Le rôle des DC dans l'effet GVL.....	41
2.Hypothèse et objectifs.....	43
2.1. Objectifs et hypothèse.....	44

2.1.1. Hypothèse: L'absence de cellules dendritiques leucémiques avant une greffe de moelle osseuse allogénique représente un facteur de risque à la rechute leucémique pour des patients avec une leucémie myéloïde chronique.	44
2.1.2. Objectifs	44
3. Article.....	46
3.1. Loss of progenitor diversity is associated with diminished production of bcr-abl ⁺ dendritic cells and shorter survival in transplanted CML patients.	46
INTRODUCTION.....	48
PATIENTS, MATERIALS AND METHODS.....	49
RESULTS	53
DISCUSSION	58
References.....	65
3.2. Résultats et tableaux	69
3.3. Figures supplémentaires.....	75
4. Discussion.....	80
4.2. Discussion	80
4.2.1. Leucémie myéloïde chronique: Biomarqueurs de progression et traitement.....	80
4.2.2. Pharmacothérapie des LMC	82
4.2.3. Les leucémie myloide chronique, un model idéal pour l'effet GVL	83
4.2.4. L'effet des TKI sur la GVL.....	85
4.2.5. La rechute qui n'explique pas tout	86
4.2.6. La GVH chez les patients subissant une allogreffe	87
4.3. Conclusion	89
3. Références.....	91

Liste des tableaux

Tableau 1: Symptômes associés à la GVH aiguë.

Tableau 2: Symptômes de la GVH chronique pouvant servir de signes cliniques diagnostiques.

Tableau 3: Critères diagnostiques chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique.

Article

Table 1: *Patients and characteristics.*

Liste des figures

Figure 1: Les mécanismes impliqués dans la reconstitution immunitaire des lymphocytes T suite à une greffe de CSH allogénique.

Figure 2: La différence entre l'effet GVL et la GVH est ségréguée par les types d'antigènes mineurs présentés par les DC lors de la stimulation des cellules T.

Article

Figure 1. Evaluation of DC proportions in CML blood samples.

Figure 2. Evaluation of the clinical significance of low DCs prior to allogeneic SCT in CML patients.

Figure 3. Defective production of DCs from patients with CML.

Figure 4. Proliferation of CML DC precursors.

Figure 5. Evaluation of the clonogenic fraction of CD34⁺ progenitor cells.

Supplemental Figure 1. Evaluation of mDC3 and monocytes in the blood of CML patients.

Supplemental Figure 2. Supplemental Figure 2. Analysis of IL-4 receptor expression.

Supplemental Figure 3. Evaluation of T and B lymphocytes and NK cells proportions in CML blood samples.

Figure supplémentaire 4. Nombre et pourcentage de DC chez les receveurs 30 jours postgreffe.

Figure supplémentaire 5. Proportion de DC à 0, 2 et 4 mois chez les patients allogreffés ayant développé une GVHc réfractaire aux traitements.

Figure supplémentaire 6. Évolution des DC au cours des 6 premiers mois de reconstitution postgreffe.

Figure supplémentaire 7. Variation du nombre de DC avant l'apparition de la GVH.

Figure supplémentaire 8. Proportions de lymphocytes T chez des patients développant une GVH.

Figure supplémentaire 9. Proportion de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ à 0, 2 et 4 mois chez les patients allogreffés ayant développé une GVHc réfractaire au traitement.

Liste des abréviations utilisées

ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë
allo-SCH	Cellules souches allogéniques
Anti-CD20	Anti-Cluster de différenciation 20
APC	Cellules présentatrices d'antigènes
B7H	Cluster de différenciation 274
BCR/ABL	<i>Breakpoint cluster region/Abelson</i>
BDCA-2	<i>C-type lectin domain family 4</i>
CCL2	Chimiokine (C-C motif) ligand 2
CD11b	Cluster de différenciation 11b
CD11c	Cluster de différenciation 11c
CD123	Cluster de différenciation 123
CD14	Cluster de différenciation 14
CD141	Cluster de différenciation 141
CD1c	Cluster de différenciation 1c
CD34	Cluster de différenciation 34
CD4	Cluster de différenciation 4
CD40L	Cluster de différenciation 40L
CD8	Cluster de différenciation 8
CD80/86	Cluster de différenciation 80/86
CLEC9A	<i>C-type lectin domain family 9, member A</i>
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CMV	Cytomégalovirus
CpG	Région ADN CpG
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSP	Cellules souches périphériques
cTEC	Cellule thymique épithéliale du cortex

CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DBR1	<i>Debranching RNA lariats 1</i>
DBR2	<i>Debranching RNA lariats 2</i>
DC	Cellules dendritiques
DLI	Infusion de leucocytes du donneur
DP	Double positif
ETP	Cellule progénitrice T précoce
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
FLT3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulin factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-monocyte colony stimulin factor</i>
GMO	Grefe de moelle osseuse
GVH	Maladie du greffon contre l'hôte
GVHa	Maladie du greffon contre l'hôte aiguë
GVHc	Maladie du greffon contre l'hôte chronique
GVL	Greffon contre leucémie
GVT	Greffon contre tumeurs
HAGE	<i>Hemagglutinin protein HagE</i>
HEV	<i>High endothelium venule</i>
HLA	Antigènes des leucocytes humains
HPE	Prolifération homéostatique
IDO	Indolamine 2-3 dioxygénase
IFN-B	Interféron Beta
IFN-G	Interféron Gamma
IgG	Immunoglobuline G
IKAROS	<i>Family zinc finger 1</i>
IL-1	Interleukine-1
IL-12	Interleukine-12
IL12p70	Interleukine-12p70
IL-15	Interleukine-15

IL-1B	Interleukine-1B
IL-2	Interleukine-2
IL-23	Interleukine-23
IL-3	Interleukine-3
IL-4	Interleukine-4
IL-6	Interleukine-6
IL-7	Interleukine-7
IL-8	Interleukine-8
LC	Cellule de Langerhans
LCK	Protéines kinase spécifiques au lymphocyte T
LIN	<i>Lineage</i>
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LPS	Lipopolysaccharide
LTC	Lymphocyte T cytotoxique
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
M-CSF	<i>Monocyte colony stimulating factor</i>
mDC1	Cellule dendritique myéloïde de type 1
mDC2	Cellule dendritique myéloïde de type 2
mDC3	Cellule dendritique inflammatoire
miHA	Antigène mineur
moDC	Cellule dendritique monocytique
mTEC	Cellule thymique épithéliale de la médulla
NK	Cellule tueuse naturelle
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PD-L1	<i>Programed cell death 1 ligand 1</i>
PR3	Proteinase 3
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen in melanoma</i>
pre-TCR	Pré-récepteur à cellules T
RAG1	Gène d'activateur de recombinaison 1
RAG2	Gène d'activateur de recombinaison 2
RIC	Conditionnement réduit

RML	Réaction mixte lymphocytaire
SCF	Facteur de stimulation de colonie
TCR	Récepteur des cellules T
TGF-B	Facteur de croissance tumorale Beta
TH1	Lymphocyte T auxiliaire 1
TH2	Lymphocyte T auxiliaire 2
Th17	Lymphocyte T auxiliaire 17
TKI	Inhibiteur de tyrosine kinase
TLR 7/8	<i>Toll like receptor 7/8</i>
TLR3	<i>Toll like receptor 3</i>
TLR4	<i>Toll like receptor 4</i>
TNF-A	Facteur de nécrose tumorale alpha
TREC	<i>T cell receptor excision circles</i>
Treg	Cellule T régulatrice

Remerciements

J'aimerais remercier le Dr. Martin Guimond, mon directeur de recherche. Le soutien qu'il a fourni pour le projet a été très précieux.

Je remercie également mes collègues du laboratoire, en particulier Stéphanie Thiant et Simon-David Gauthier. Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire du Dr. Denis-Claude Roy et du Dr. Jean-Sébastien Delisle, en particulier Jean-Philippe Bastien, Jessica Trottier, Marie-Pier Giard et Louis-Philippe Caron. Je vous souhaite bonne chance dans vos recherches.

Un merci particulier aux Dr. Jean-Sébastien Delisle et Dr. Michel Duval pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

"I know I have got to hold out for that. They don't give it to you if you have passed away. I got to hold out for that."

29 septembre 2011

Ralph M.Steinman (14 janvier 1943-30 septembre 2011)

1. Introduction

1.1. La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques a été développée pour traiter les déficits hématologiques congénitaux. Parmi ces maladies sont incluses : les anémies, les immunodéficiences majeures ainsi que les hémopathies malignes, dont les leucémies, les lymphomes et les myélomes multiples. Il existe deux types de greffe de CSH : la greffe autologue et la greffe allogénique.

1.1.1. La greffe de CSH allogénique

La greffe de CSH allogénique (allo-CSH) requière un donneur auquel sont prélevées des cellules progénitrices hématopoïétiques. Celles-ci sont injectées au patient malade afin de remplacer son système hématopoïétique détruit par la chimiothérapie. C'est en 1959 que la première allo-CSH a été effectuée¹. Il faudra attendre jusqu'à 1980 pour que ce type de traitement devienne un traitement de première ligne dans notre système de santé. Aujourd'hui, l'allo-CSH constitue la seule thérapie cellulaire disponible pour guérir les leucémies et autres désordres hématologiques qui peuvent être mortels. La greffe de CSH allogénique permet, dans un premier temps, de régénérer un nouveau système hématopoïétique à partir des cellules souches du donneur. Dans un deuxième temps, les cellules immunocompétentes contenues dans le greffon, notamment les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ ainsi que les cellules NK (Tueuses naturelles)², exercent une activité immunologique contre les cellules leucémiques résiduelles du patient. Cette activité, connue sous le nom de réaction du greffon contre la leucémie (GVL), est en grande partie responsable du succès de l'allogreffe chez les sujets atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC).

1.1.2. La greffe de CSH autologue

La greffe de CSH autologue est le second type de greffe couramment utilisé pour traiter les tumeurs hématologiques. Les indications de la greffe autologue sont bien définies et concernent surtout les myélomes et les lymphomes. Malgré tout, on peut utiliser la greffe autologue pour traiter certaines leucémies aiguës et chroniques, mais les succès sont généralement moindres. L'autogreffe de CSH permet d'augmenter considérablement les doses de chimiothérapie afin d'induire une élimination maximale des cellules leucémiques tout en demeurant dans les normes de toxicité sur le système hématopoïétique du patient. La contamination du greffon par les cellules tumorales représente par contre une limitation importante du traitement. Il est alors possible de diminuer la contamination du greffon en prélevant les cellules souches hématopoïétiques à la fin du cycle de chimiothérapie. C'est à ce moment que la charge tumorale est réduite à son maximum et que les cellules progénitrices saines émergent. Idéalement, il est préférable d'avoir recours à des méthodes additionnelles de purge du greffon afin d'éliminer les cellules tumorales contaminantes. Par exemple, dans le cadre du lymphome non hodgkinien, le Rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CD20, peut être utilisé ex vivo pour diminuer les cellules cancéreuses du greffon³, par contre l'effet clinique sur la survie globale et la survie sans progression est discutable^{4,5}. D'ailleurs, dans un contexte de LMC, cette technique est difficilement applicable puisque les cellules tumorales expriment une variété de récepteurs de surface dont certains se retrouvent également sur les cellules progénitrices saines. En général, l'autogreffe est moins toxique pour le patient et la reconstitution immunitaire suite à la greffe est meilleure. Cependant, on observe une fréquence plus élevée de rechute leucémique qui serait liée à l'absence d'effet GVL⁶.

1.2. Les sources de CSH et la chimiothérapie

1.2.1. La moelle osseuse et le sang périphérique

Les CSH résident principalement dans la moelle osseuse. Plusieurs études ont démontré que les CSH immatures expriment le récepteur de surface CD34 et possèdent la capacité de régénérer un système hématopoïétique complet^{7,8}. Pendant plusieurs années, la moelle osseuse était obtenue par ponction au niveau des os plats, ce qui compliquait l'accessibilité à ces cellules. Depuis quelques années, des facteurs de croissance comme le m-SCF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*) ou le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) sont utilisés afin d'induire la migration des CSH de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Grâce à ce type d'intervention, le prélèvement du greffon, qui auparavant devait être fait dans une salle d'opération, peut maintenant s'effectuer par cytophérèse.

1.2.2. Le sang de cordon

Le sang de cordon constitue une troisième source de CSH. Découvert en 1974, le sang de cordon présente l'avantage d'être facilement disponible puisque les cellules sont obtenues à partir du cordon ombilical récupéré après la naissance du nouveau-né⁹. Plusieurs études ont démontré que ce type de greffe entraînait une diminution du risque de développer une maladie du greffon contre l'hôte (GVH). Cette propriété des CSH de cordon serait possiblement due à une plus grande proportion de cellules T immatures ou encore au nombre important de cellules immunosuppressives retrouvées dans le sang de cordon^{10,11}. Malheureusement, la reconstitution immunitaire et myéloïde est plus lente. On observe aussi une augmentation de l'absence de prise de la greffe chez les patients¹². De plus, le nombre restreint de CSH retrouvés dans un cordon

ombilical est généralement insuffisant pour greffer un patient adulte, ce qui nécessite donc l'utilisation de plusieurs cordons pour effectuer une greffe chez un individu.

1.2.3. La compatibilité: le système HLA

Dans le cadre d'une greffe de CSH allogénique, le couple donneur-receveur doit posséder une compatibilité pour les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Généralement, cette compatibilité se retrouve dans la famille immédiate du patient. Toutefois, en absence de donneur familial compatible, la greffe peut être effectuée à partir de CSH d'un donneur non apparenté HLA-compatible . L' histocompatibilité maximale possible est de 12 allèles sur 12, ce qui est observable en cas de greffe d'un donneur apparenté. Lorsque la greffe provient d'un donneur non-apparenté, 10 allèles sont séquencées. Une compatibilité de 10/10 est la plus élevée possible, avec une compatibilité parfaite obligatoire au niveau du HLA-A, -B et -C¹³. Les HLA I et II sont sous-divisés en trois différents groupes comprenant les HLA I des groupes A, B et C et les HLA II des groupes DR, DQ et DP¹⁴. La greffe de sang de cordon permet d'accepter un degré d'incompatibilité HLA plus grand entre le donneur et le receveur (compatibilité de 4 à 6 antigènes majeurs HLA-A, B, DR)¹⁵.

1.2.4. Traitement chimiothérapeutique et leucopénie

Avant une greffe de CSH allogénique ou autologue, le patient reçoit une chimiothérapie intensive avec ou sans radiothérapie qui a pour but d'éliminer les cellules leucémiques. Cette étape de préparation appelée « conditionnement » est nécessaire et induit aussi une immunosuppression complète du patient. Ce « conditionnement » va aussi favoriser la prise du greffon et permettre d'éviter le rejet de greffe. Le conditionnement prégreffe se compose d'une chimiothérapie couplée ou non à une irradiation corporelle totale (TBI). En fonction de son intensité d'immunosuppression et du degré de myéloablation, on distingue deux types de

conditionnements: un conditionnement myéloablatif et un conditionnement d'intensité réduite non myéloablatif.

1.2.4.1. Le conditionnement myéloablatif

Le conditionnement myéloablatif a été le 1^{er} traitement prégreffe utilisé pour traiter des patients souffrant de maladies hématologiques malignes et qui étaient éligibles pour une greffe de CSH allogénique. Ce type de traitement est hautement toxique et induit une destruction complète de la moelle osseuse. Le traitement va donc se limiter à une utilisation chez des patients généralement plus jeunes ne présentant pas de facteurs de comorbidité associés. Le conditionnement myéloablatif peut être associé à une chance de GVHD de grade II à IV supérieur en moyenne de 27% pour non-myéloablatif. La prépondérance des GVHD III-IV est encore plus élevé, soit respectivement de 35% versus 17%^{16,17}. Celui-ci entraîne également une lymphopénie sévère qui peut perdurer pendant plusieurs années suite à la greffe de CSH. Ce type de greffe est donc associé à un risque de mortalité important.

1.2.4.2. Le conditionnement à intensité réduite

Dans les années 80, les chimiothérapies d'intensités réduites ont été développées afin de diminuer la toxicité reliée au traitement¹⁸. Ce type de conditionnement permet de greffer des personnes plus âgées et/ou présentant des facteurs de comorbidités important^{19,20}. De plus, des patients atteints de maladies hématologiques difficilement traitables par des traitements standards ont pu être pris en charge grâce à cette nouvelle approche. Ceci incluant les leucémies myéloïdes aiguës et les syndromes myélodysplasiques, alors reconnus comme incurables²¹. Le degré de lymphopénie et d'inflammation est généralement moins important suite à la greffe de CSH, ce qui pourrait favoriser une meilleure reconstitution du système immunitaire^{22,23}. Les conditionnements réduits assurent une aussi bonne prise du greffon que les traitements

conventionnels. Nous observons aussi un effet GVL efficace ainsi qu'une fréquence moins élevée d'infections bactériennes et fongiques chez les individus traités avec un conditionnement réduit^{24,25}. Les réactivations au cytomégalovirus (CMV) seraient aussi moins fréquentes chez les patients recevant un conditionnement d'intensité réduite²⁶. Le développement de chimiothérapies moins invasives permet aujourd'hui de traiter des patients qui autrefois n'étaient pas admissibles à la greffe de CSH allogénique.

1.4. La régénération du compartiment lymphocytaire chez l'homme

Suite à la perte des lymphocytes T, deux voies principales de reconstitution immunitaire sont possibles : la voie thymique et la prolifération homéostatique (HPE) des lymphocytes T matures contenus dans le greffon.

1.4.1. La voie thymique

Chez les patients greffés, la reconstitution immunitaire à long terme des lymphocytes T naïfs ayant un répertoire diversifié est faite au niveau du thymus. Ce type de reconstitution immunitaire, qui est essentielle au processus de défense immunitaire, revient de façon très lente. Cet intervalle de temps est de 6 à 18 mois chez les patients jeunes et entre 10 à 30 ans chez les patients plus âgés²⁷. La reconstitution serait d'ailleurs gravement affectée par la chimiothérapie et la Maladie du greffon contre l'hôte aiguë (GVHa)²⁸.

La différenciation des lymphocytes T implique plusieurs événements majeurs qui se produisent au niveau de la moelle osseuse et du thymus. Au niveau de la moelle osseuse, les CSH présentes se différencient en cellules progénitrices thymiques (ETP). Les ETP, bien que faisant partie principalement de la lignée des cellules souches des lymphocytes T, ont encore la possibilité de se différencier en d'autres types cellulaires, dont les cellules dendritiques et les

lymphocytes B²⁹. Les ETP qui arrivent au thymus perdent éventuellement cette plasticité et deviennent des cellules doubles négatives (DN) pour les récepteurs CD4 et CD8. Le phénomène de réarrangement des gènes du TCR survient au stade DN3 et est induit par l'activation des gènes RAG1 et RAG2. Suite au réarrangement de la chaîne bêta du TCR, la cellule commence à exprimer les co-récepteurs CD4 et CD8 et ce stade est appelé double positif (DP). Ceci est ensuite suivi par le réarrangement du locus de la chaîne- α et de l'expression membranaire de récepteurs des lymphocytes T alpha-beta (TCR- $\alpha\beta$)^{30,31}.

Lors de la différenciation thymique, deux étapes de sélection se mettent en place. Le premier mécanisme de sélection des lymphocytes T est la sélection positive, se produisant au niveau de la médulla thymique. Elle permet seulement aux cellules qui reconnaissent le complexe majeur d'histocompatibilité présent sur les CPA de survivre. Lors de cette étape, si le TCR de la cellule se lie à une molécule CMH I, la cellule conserve et maintient l'expression du récepteur CD8 et perd le CD4. Par contre, une liaison avec le CMH II entraîne la perte du récepteur CD8 et le maintien du CD4³². Le deuxième mécanisme de sélection est la sélection négative. Lorsque l'affinité du TCR pour le CMH dépasse un certain seuil, la cellule est alors éliminée³³. Le processus de sélection négative a pour but d'éliminer les lymphocytes T auto-réactifs afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes. Certaines cellules CD4⁺ possédant une affinité plus grande pour le TCR peuvent survivre à la sélection négative et devenir des cellules T régulatrices (Treg)³⁴. Par contre, les mécanismes de sélection des cellules Treg demeurent encore peu connus. Les thymocytes relâchés par le thymus sont appelés émigrants thymiques récents ou RTE et poursuivent leur maturation en périphérie.

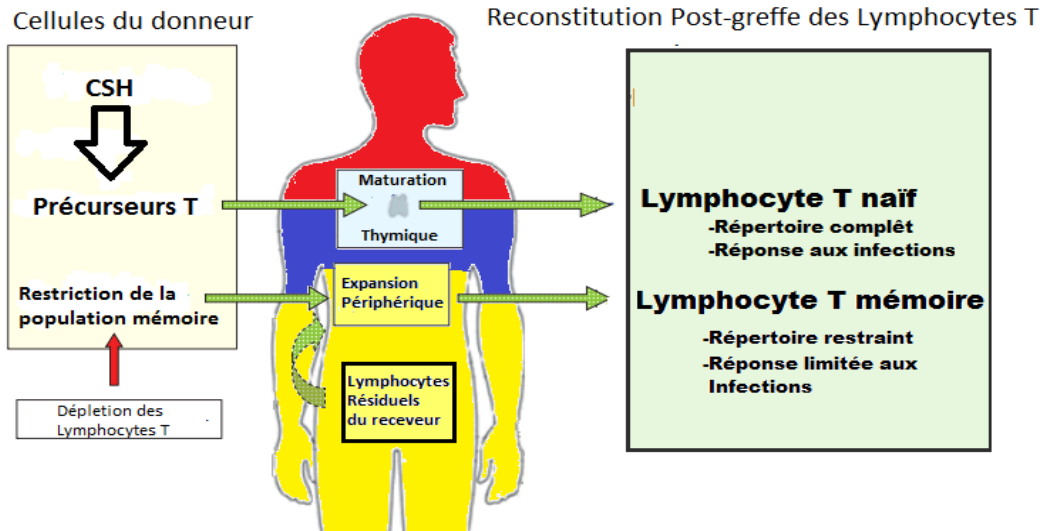


Figure 1: Les mécanismes impliqués dans la reconstitution immunitaire des lymphocytes T suite à une greffe de CSH allogénique. Inspiré de Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again (2012) Tissue antigens

1.4.2. La sénescence thymique causée par le vieillissement

La fonction thymique est particulièrement robuste lors du stade foetal et du développement périnatal. Pour des raisons encore méconnues, cette fonction décline graduellement avec l'âge. L'involution thymique âge-dépendante serait associée à une diminution de la production des thymocytes. L'involution serait en partie causée par l'effondrement des différents épithéliums thymiques et par la perte de la jonction cortico-médullaire³⁵. Chez un adulte âgé entre 35 et 45 ans, le thymus contiendrait moins de 5-10% de sa cellularité initiale tout en gardant un ratio semblable entre le compartiment des thymocytes et celui des cellules épithéliales thymiques^{36,37,38}. Or ces résultats supportent un modèle où les acteurs cellulaires de la fonction thymique seraient particulièrement affectés par le vieillissement. Les changements en cellularité sont caractérisés par une infiltration massive d'adipocytes, une diminution importante du nombre de mTEC (cellule thymique épithéliale de la médulla) et une augmentation des cTEC (cellule thymique épithéliale du cortex)³⁹. Cette dégénérescence thymique apporte des changements importants à la composition du compartiment périphérique des cellules T. Dans certains cas, ces

changements peuvent entraîner une diminution de la diversité du répertoire T en périphérie et une augmentation de la susceptibilité à certains types de maladies infectieuses⁴⁰. Les causes biologiques de l'involution thymique demeurent toutefois largement inconnues.

Le thymus ne possède pas de « réservoir » intrinsèque de cellules souches lymphoïdes et l'apport en cellules souches progénitrices proviendrait de la moelle osseuse. Les SCH de la moelle osseuse seraient aussi affectées par le vieillissement, ce qui aurait pour conséquence une réduction de la production des cellules lymphoïdes progénitrices⁴¹. L'injection de cellules progénitrices compétentes dans des souris âgées ne semble toutefois pas avoir d'effet significatif sur la prévention de l'atrophie thymique, ce qui suggère que le thymus deviendrait dysfonctionnel en vieillissant⁴². D'autres études indiquent que la perturbation d'autres facteurs extrinsèques comme le *crossstalk* TEC/ETP, la diminution de production du facteur d'inhibition des leucémies (LIF), de l'oncostatine M (OSM) pourraient affecter la fonction thymique⁴³. Une étude chez la souris a en effet démontré qu'un thymus atrophié transplanté chez un receveur plus jeune pouvait se revigorer⁴⁴.

La voie thymique est essentielle à la reconstitution immunitaire d'un répertoire de lymphocytes T diversifié. Malheureusement, à cause de l'involution thymique, cette voie est généralement inefficace et ne permet pas la reconstitution des lymphocytes T suite à la greffe de cellules souches allogéniques. De plus, il est bien connu que le thymus humain est très sensible à la chimiothérapie, ce qui pourrait expliquer pourquoi la présence de TREC(*T cell receptor excision circles*) sanguin est généralement plus faible chez les receveurs que chez les donneurs au niveau des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺^{45,46}. Cette différence est par ailleurs accentuée chez les patients développant une GVH. En l'absence de nouveaux lymphocytes T naïfs, on observe

un appauvrissement naturel du répertoire T et ceci devient particulièrement évident chez les personnes âgées qui subissent une greffe de CSH⁴⁷.

Chez les patients ayant une reprise de la fonction thymique, la sélection négative effectuée pouvant s'effectuer par les APC du donneur pourrait permettre l'instauration d'une tolérance chez les lymphocytes T produits de novo à partir des CSH du donneur⁴⁸. Dans ce contexte, il est peu probable que la tolérance induite par le thymus puisse inhiber la réponse anti-leucémique puisqu'il est improbable que les antigènes leucémiques soient exprimés par les CPA du donneur au niveau du thymus⁴⁹.

1.4.3. La prolifération homéostatique des cellules T matures

L'expansion homéostatique est une voie de reconstitution des lymphocytes T qui repose sur la prolifération des lymphocytes T périphériques résiduels. Ce mécanisme a été identifié pour la première fois chez des souris athymiques lymphopéniques qui avaient reçu un inoculum de lymphocytes T. La prolifération homéostatique permet de reconstituer durablement le compartiment des lymphocytes T périphérique des animaux receveurs.

Chez une majorité des greffés médullaires, la fonction thymique est généralement insuffisante pour reconstituer un répertoire complet de lymphocytes T. Dans ce contexte, la prolifération homéostatique demeure l'unique façon de ramener des comptes lymphocytaires à des valeurs normales. Cette particularité des cellules T à proliférer intensivement dans un hôte lymphopénique serait due, en partie, à l'absence de thymopoïèse et à un excès de ressources^{50,51}. Des études fonctionnelles ont démontré que l'IL-7 et la stimulation du TCR étaient tous deux requis pour la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs⁵². Pour la cellule CD8⁺ mémoire, la stimulation du TCR serait dispensable et l'IL-15 seule serait suffisante pour induire

l'expansion homéostatique⁵³. Les éléments requis pour la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ mémoires demeurent encore peu connus, mais pourraient aussi impliquer l'IL-7 avec ou sans signal provenant du TCR⁵⁴. Ces différences au niveau des éléments requis pour induire la survie et l'expansion homéostatique pourraient expliquer pourquoi les lymphocytes T CD8⁺ reviennent rapidement à des valeurs normales. Par contre, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent prendre plusieurs mois ou années avant de revenir à des valeurs normales⁵⁵. Chez les patients qui reçoivent une greffe allogénique, la lymphopénie est généralement plus sévère et pourrait être causée par le faible inoculum de lymphocytes T administré au moment de la greffe⁵⁶. Des études récentes ont démontré que l'alloréactivité induirait des changements fonctionnels au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ceci aurait un effet adverse sur la survie et l'expansion homéostatique des lymphocytes T^{57,58}. Les médicaments administrés en prophylaxie ou en traitement de la GVH ont aussi un rôle important à jouer dans le maintien de la lymphopénie chez les patients greffés^{59,60,61,62,63}. Or, l'acquisition de l'immunocompétence du patient dépend en grande partie de l'efficacité de la reconstitution immunitaire par expansion homéostatique. Dans un contexte où la diversité de niche périphérique des lymphocytes T CD4⁺ est réduite par les effets délétères de la GVH, les patients deviennent généralement plus sujets aux infections.

1.5. Les complications postgreffe majeures : la rechute et la GVH

1.5.1. Réaction du greffon contre l'hôte ou GVH

Dans un contexte d'allogreffe, la GVH survient lorsque les lymphocytes T du donneur reconnaissent et détruisent les tissus sains de l'hôte⁶⁴. Il existe 2 types de GVH : la GVH aiguë et la GVH chronique (GVHc). La GVHa survient typiquement dans les 100 jours qui suivent la greffe de CSH alors que la GVHc survient généralement plus tard. Bien que ces deux

complications soient toutes deux reliées à l'alloréactivité, la physiopathologie de la GVH aiguë et chronique demeurent très distinctes.

1.5.1.1. Réaction du greffon contre l'hôte aiguë

La maladie du greffon contre l'hôte aiguë est l'une des complications les plus importantes à survenir suite à une greffe de moelle osseuse allogénique. Les disparités pour les antigènes majeurs d'histocompatibilités ou pour les antigènes mineurs d'histocompatibilités sont en grande partie responsables de l'initiation de l'alloréactivité. Les couples donneur-receveur apparentés ont généralement une incidence de GVH plus faible (35-45%) que les couples donneur-receveur non apparentés (50-80%)^{65,66,67} La GVHa est divisée en différents stades selon la gravité de la maladie (tableau 1)⁶⁸.

Tableau 1: Symptômes associés à la maladie du greffon contre l'hôte aiguë

Grades	Symptômes
I	-25% de la peau
II	-50% de la peau -Début d'atteinte au foie
III	-50% de la peau et l'intestin -Atteinte au foie -Crampe douloureuse -Diarrhée -25% de survie
IV	-Cloche sur la peau -Dysfonctions hépatiques -Dégradation importante de l'épithélium intestinal -5% de survie

Selon le modèle de Ferrara, on dénombre 3 phases distinctes dans le développement de la GVHa. Premièrement, il y a une libération massive de cytokines pro-inflammatoire, aussi appelé tempête de cytokines. Celle-ci, est causée par les dommages aux tissus lors du conditionnement avant la greffe et conduit à l'activation des CPA du patient, principalement les cellules dendritiques.

L'activation des CPA du receveur augmente la présentation antigénique et permet l'activation des lymphocytes T du donneur contre des déterminants antigéniques du receveur^{69,70}. Les cellules T activées sortent des ganglions lymphatiques et retournent au niveau des tissus inflammés où ils exerceront une cytotoxicité directe ou indirecte contre les cellules du receveur. La destruction des tissus de l'hôte contribue à augmenter l'inflammation et la présentation antigénique. Ceci a pour effet de créer une boucle de rétroaction positive qui favorise l'activation des lymphocytes T alloréactifs⁷¹.

Le conditionnement prégreffe joue un rôle important dans l'initiation de la GVH puisqu'il contribue aux dommages cellulaires qui entraînent le relâchement de cytokines pro-inflammatoires tel que le TNF- α , IL-1 et IL-6^{72,73}. Ces cytokines favoriseraient l'activation des lymphocytes T du donneur. Les chimiothérapies à intensité réduite auraient une toxicité moins importante pour les tissus du patient et ceci pourrait expliquer la diminution de l'incidence de la GVH chez les patients qui reçoivent ce type de chimiothérapie. L'activation des cellules du donneur mène à une expansion rapide ainsi qu'à la production importante de cytokines de type TH1 telles que l'IL-2 et l'INF- γ . Ces cytokines agissent sur la prolifération des lymphocytes T, mais aussi sur l'expression des molécules du CMH I et II des CPA^{74,75}. Les cellules NK activées contribuent substantiellement à la production totale d'INF- γ et l'immunogénicité des CPA. Les lésions au niveau du tube digestif vont également libérer des substances microbiennes comme le

lipopolysaccharide (LPS) ainsi que des molécules associées aux pathogènes (PAMP) qui vont augmenter l'activation des DC par signalisation via les récepteurs Toll-like (TLR)⁷⁶. Les cytokines libérées au cours de la GVH ont un rôle clé dans l'activation, mais aussi dans le maintien des fonctions effectrices des cellules T, des cellules NK et des cellules présentatrices d'antigènes. Bien que ce phénomène puisse entraîner un choc septique et causer la mort, il va principalement être impliqué dans la progression de la GVH aiguë, menant alors à des dommages importants au niveau de la peau, des intestins et du foie.

1.5.1.2. Réaction du greffon contre l'hôte chronique

La maladie du greffon contre l'hôte chronique constitue une des limites thérapeutiques les plus importantes chez les patients subissant une greffe de moelle osseuse allogénique. L'incidence de celle-ci chez l'adulte est élevée, soit de 25-80%, selon la compatibilité qui existe entre le donneur et le receveur. La GVHc constitue un facteur de morbidité et de mortalité très important malgré l'association importante entre la GVHc et l'effet GVL^{77,78}. Elle présente des manifestations cliniques très hétérogènes selon les organes atteints et la sévérité de la maladie peut varier fortement d'un patient à l'autre^{79,80}. La GVHc est reconnue comme une maladie distincte de la GVHa, et non plus comme une extension de celle-ci⁸¹. Alors que la GVHa est caractérisée par une inflammation et un environnement nécrotique important au niveau des organes (Tableau 1). La GVHc, pour sa part, se manifeste surtout par une fibrose et une inflammation chronique qui affectent un éventail plus large de tissus que ce qui est habituellement retrouvé dans la GVHa. Les signes cliniques de la GVHc comportent des similitudes avec ceux retrouvés chez les patients atteints de maladies auto-immunes systémiques. Parmi eux, on retrouve la dépigmentation (vitiligo-like), bronchiolite oblitérante et le syndrome

fribrotique (Tableau 2). Ces symptômes sont uniques à la GVHc et peuvent être utilisés pour son diagnostique.⁸²

Tableau 2: Symptômes de la GVHc pouvant servir de signes cliniques diagnostiques

Organe atteint	Symptômes uniques à GVHc
Peau	-Dépigmentation (vitiligo-like)
Scalpe et pilosité	-Scarification -Écaillage et lésions
Bouche	-Xénostomia -Mucocele -Atrophie -Ulcère
Yeux	-Douleurs et sécheresse -Conjonctivite cicatrisante -Kératopathie
Partie génitale	-Érosions , fissures et ulcères
Poumons	-Bronchiolite oblitérante
Muscles et articulations	-Myositis ou polymyosite

1.5.2. GVH et GVL: La jonction entre bénéfique et néfaste

1.5.2.1. L'immunité antitumorale ou effet GVL (greffon versus leucémie)

Les traitements intensifs de radiothérapie et de chimiothérapie administrés aux patients avant la greffe allo-CSH sont responsables en grande partie de la destruction des cellules leucémiques. Malheureusement, il est fréquent de détecter des cellules leucémiques résiduelles suite à la chimiothérapie, c'est ce qu'on appelons la maladie minimale résiduelle. Dans ce contexte d'allogreffe, les lymphocytes T du donneur seraient responsables de l'élimination des cellules leucémiques résiduelles et pourraient ainsi prévenir la rechute leucémique.

L'effet GVL après une greffe allogénique est l'une des immunothérapies les plus efficaces à ce jour⁸³. Comme pour la GVH, les CPA seraient essentielles dans la génération d'un effet GVL. Ce sont principalement les cellules dendritiques de l'hôte qui seraient responsables de cet effet immunologique, mais ceci n'exclut pas un rôle possible des CPA du donneur lorsque la charge tumorale est faible^{84,85}.

L'effet GVL peut dépendre de la présence d'incompatibilité(s) majeure(s) au niveau des molécules du CMH. Mais, généralement, il va dépendre d'une incompatibilité au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilités (miHA) et/ou de la présence de peptides tumoraux retrouvés à la surface des cellules tumorales⁸⁶. Les miHA, caractérisés par des protéines polymorphiques, ont un rôle essentiel dans l'effet GVL qui a été clairement démontré *in vitro* et chez la souris. L'activation des cellules T par les miHA présents au niveau de la tumeur ou ceux partagés par les tissus de l'hôte et de la tumeur serait à la base de l'effet GVL⁸⁷. Il semblerait d'ailleurs que la présence de miHA allogéniques immunodominants, plutôt que les antigènes associés aux tumeurs, ait le rôle central dans l'effet GVL^{88,89,90,91}.

Le rôle des cellules T dans la GVH et la GVL est supporté par des modèles précliniques qui ont démontré que la déplétion des lymphocytes T diminuait considérablement le risque de développer une GVH, mais augmentait aussi les rechutes leucémiques⁹². Avec l'augmentation de l'utilisation des conditionnements réduits, la présence d'une interconnexion entre la GVH et la GVL est de plus en plus claire dans la prévention de la rechute tumorale. Le type de présentation antigénique ainsi que la nature des antigènes présentés pourraient avoir un rôle fondamental sur l'activité GVL et GVH des lymphocytes T alloréactifs. L'injection de leucocytes du donneur augmente considérablement l'effet GVL, mais est souvent compliquée par la GVH^{93,94}. L'effet GVL est particulièrement efficace puisqu'il va permettre de contourner les problèmes

d'immunoéditions chez les cellules leucémiques résiduelles grâce à une réponse anti-leucémique polyclonale⁹⁵.

L'effet GVL le mieux caractérisé provient d'études effectuées chez des sujets ayant une leucémie myéloïde chronique. Dans ce type de maladie, la présence de la translocation 9;22 mène à la production d'une protéine chimérique BCR/ABL et l'expression de peptides provenant de la jonction de cette protéine oncogénique. On parlera plus spécifiquement de la LMC dans les pages suivantes.

1.6. Le rôle des cellules dendritiques en greffe de CSH

En 1973, Ralph Steinman, avec l'aide de son complice Zanvil Cohn, identifiait un nouveau type cellulaire au niveau des organes lymphoïdes de la souris^{96,97}. Pourtant, 100 ans plus tôt, Paul Langerhans décrivait des cellules à morphologie similaire au niveau de l'épiderme cutané⁹⁸. Ces cellules, appelées cellules dendritiques, ont un rôle essentiel pour faire le lien entre l'immunité innée et acquise⁹⁹. Les cellules dendritiques sont une population de cellules très hétérogènes, qui, essentiellement, ont pour fonction de présenter des antigènes aux lymphocytes T via les molécules du CMH de classe I ou II. Les CPA sont divisées en différentes classes selon leurs fonctions dans la réponse immunitaire^{100,101}.

1.6.1. Les principales populations de cellules dendritiques

Contrairement au système lymphoïde qui prend généralement plusieurs mois ou années à se régénérer suite à une greffe allogénique, les cellules myéloïdes se régénèrent plus rapidement. Plusieurs études ont démontré le rôle important des DC du receveur dans l'initiation de la GVH. Dans un contexte de LMC, la présence de DC leucémiques pourrait expliquer les succès de

l'allogreffe chez ces patients puisqu'elles ont le potentiel de présenter des antigènes tumoraux. La reconstitution suite à l'allo-CSH des DC est donc importante pour l'immunocompétence du patient. Il existe plusieurs types de DC avec des rôles parfois encore mal définis. Cette section se veut un résumé des connaissances acquises au cours des dernières années sur les différentes populations de DC.

1.6.1.1. Les cellules dendritiques inflammatoires

Les cellules dendritiques inflammatoires, aussi appelées mDC3, expriment à leur surface cellulaire les récepteurs $HLADR^+Lin^-CD11c^{hi}CD16^+$. Les mDC3 proviendraient de la conversion des monocytes sanguins $CD14^+HLADR^+$ ou directement des DC myéloïdes (mDC) présents dans le système lymphatique^{102,103}. Ces cellules se retrouvent principalement dans le sang, le système lymphatique, la rate, les ganglions ainsi que les tissus. Les études cliniques ont démontré une association entre le nombre de mDC3 et l'inflammation systémique qui est associée à une diminution de la survie chez les patients en septicémie¹⁰⁴. Les DC inflammatoires seraient aussi impliquées dans l'établissement d'une réponse Th1 robuste, probablement via une production élevée d'IL-12^{105,106}. D'ailleurs, la neutralisation de la chimiokine CCL2 ainsi que l'élimination des DC inflammatoires réduisent considérablement la réponse Th1¹⁰⁷.

1.6.1.2. Les cellules dendritiques myéloïdes

Les DC myéloïdes de type 1 (mDC1) expriment les récepteurs de surface $HLADR^+Lin^-CD11c^{hi}CD1c^+$ au niveau de la moelle osseuse et dans le système périphérique chez l'humain. Les DC myéloïdes proviennent de la branche des cellules progénitrices myéloïdes positives pour le récepteur $FLT3^+$ et qui dépendent du FLT3 ligand (FL)¹⁰⁸. Les mDC1 produisent des quantités importantes d'IL-12, une cytokine essentielle pour le développement d'une réponse Th1, mais

aussi pour la sécrétion d'IL-10 dans certaines conditions^{109,110}. Les mDC1 produisent aussi du GM-CSF, TGF- β , IL-1, IL-6, IL-23 ainsi que certaines chimiokines essentielles au développement de différents types de réponses immunitaires (TH1, TH2, TH17 ou autres)^{111,112}. Au niveau des organes riches en endotoxines et en antigènes commensaux comme l'intestin, les mDC1 sont très nombreuses et joueraient un rôle dans la tolérance immunitaire à ces antigènes¹¹³. Dans un contexte de greffe de CSH allogénique, les mDC1 pourraient prévenir la mortalité en diminuant la morbidité liée à l'inflammation^{114,115}.

Les DC myéloïdes de type 2 possèdent les récepteurs HLADR⁺Lin⁻CD11c⁺CD141c^{hi}. Ces DC sont essentielles pour l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) en réponse à certains virus. Elles sont caractérisées par une expression élevée du récepteur TLR3 et produisent des quantités importantes d'IL-12p70 et d'IFN- β une fois stimulées^{116,117}. Elles excellent dans l'induction de la réponse Th1 et dans la présentation croisée (*cross-présentation*) d'antigènes nécrotiques exogènes par la molécule du CMH de classe I. Cette caractéristique leur est spécifique grâce à l'expression presque exclusive de CLEC9A, un récepteur spécialisé dans la reconnaissance des cellules endommagées^{118,119,120}. Suite à une activation des TLR3 et TLR7/8, ces DC produisent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α ¹²¹.

1.6.1.3. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) humaines expriment les récepteurs HLADR⁺Lin⁻BDCA-2⁺CD123⁺ au niveau de la moelle osseuse et du sang périphérique¹²². Elles ont initialement été décrites comme des cellules produisant des quantités importantes d'interféron de type 1^{123,124}. L'ontogénie des pDC demeure toutefois encore mal connue. Des études

effectuées chez des souris génétiquement modifiées pour le gène FL ont démontré que le FL était important dans le développement des pDC^{125,126}. Chez l'humain, le rôle du FL a été confirmé suite au traitement de sujets sains où le nombre de pDC augmentait significativement après son injection intraveineuse¹²⁷. Le GM-CSF est une autre cytokine importante pour les pDC, puisqu'il serait essentiel à la mobilisation des pDC au niveau de la moelle osseuse¹²⁸.

Les pDC ont d'abord été décrites comme des cellules produites exclusivement à partir des cellules progénitrices lymphoïdes (CLP) puisque ces cellules exprimaient le transcrit de pré-TCR¹²⁹. Des expériences effectuées chez la souris ont démontré que l'expression d'IKAROS, un facteur de transcription associé à la lignée lymphoïde, était aussi nécessaire à la maturation des pDC¹³⁰. Curieusement, d'autres travaux indiquaient que les cellules progénitrices myéloïdes communes (CMP) pouvaient se différencier en mDC, mais aussi en pDC aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*¹³¹. Malgré le fait que les CMP n'expriment pas de transcrit de pré-TCR, les pDC différenciés à partir des CMP l'expriment éventuellement¹³². Ces travaux suggèrent que les pDC seraient générés à partir de différentes lignées de cellules souches hématopoïétiques alors que les DC lymphoïdes ou myéloïdes se différencieraient uniquement à partir de CMP. La maturation des pDC a lieu exclusivement dans la moelle osseuse. Une fois matures, elles migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires, particulièrement dans les zones riches en cellules T telles que les HEV (*high endothelial venule*)¹³³.

Les pDC possèdent des récepteurs TLR qui diffèrent des mDC, soit les TLR7 et TLR9¹³⁴. La stimulation des TLR par des agonistes tel que des acides nucléiques viraux, permettent une réponse antivirale rapide lors d'une infection. La production massive d'IFN de type 1 et d'IL-12 par les pDC confère à ces cellules un rôle clé dans la défense antivirale. L'interféron- α induit l'activation des cellules NK tout en augmentant la protection des cellules saines contre la

cytolysé¹³⁵. L'IFN- α augmente aussi la polarisation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 et induit la production IgG par les lymphocytes B^{136,137}. Les pDC produisent aussi des chimiokines chemoattractantes pour les cellules T et B, permettant ainsi de stimuler la réponse T et B ou favoriser l'anergie de ces cellules dépendamment du statut d'activation de la pDC^{138,139}.

Les pDC n'excellent toutefois pas dans la présentation antigénique puisque l'endocytose serait beaucoup moins performante que chez les DC myéloïdes¹⁴⁰. L'expression des molécules du CMH seraient moins importantes comparativement aux autres types de DC. En effet, les pDC utilisent le promoteur de transcription CTIIA III qui n'induit pas une augmentation de l'expression des molécules du CMH II suite à l'activation de la pDC.¹⁴¹ L'activation virale des pDC peut entraîner une forte réponse Th1 chez les lymphocytes T. Par contre, dans des conditions allogéniques ou en abondance d'IL-3 et de CD40L, les pDC vont favoriser une polarisation Th2¹⁴².

Les pDC sont capables d'induire une profonde anergie chez les lymphocytes T CD4⁺, un phénomène qui peut être inversé par l'injection IL-2. Elles peuvent aussi augmenter la tolérance en produisant de l'IL-10 ou en favorisant la prolifération des Treg^{143,144,145}. La stimulation des pDC avec un ligand CTLA-4 induit une forte expression d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui diminue le tryptophane circulant et diminue l'activation et la réponse des lymphocytes T^{146,147}. L'absence de pDC chez la souris serait associée à une augmentation considérable des maladies inflammatoires, suggérant un rôle des pDC dans la protection contre l'inflammation déclenchée par des antigènes inertes¹⁴⁸.

1.6.2. Génération et facteurs de différenciation des DC

À cause des difficultés techniques pour isoler les DC, une grande partie des connaissances que nous avons sur celles-ci proviennent de DC différenciées et produites *in vitro* à partir des cellules souches progénitrices de la moelle osseuse ou de la fraction adhérente des cellules mononucléées du sang.

1.6.2.1. GM-CSF, IL-4 et TNF- α

L'utilisation combinée du GM-CSF (*Granulocyte monocyte colonie stimulating factor*) d'IL-4 et de TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) permet de différencier des DC à partir de cellules souches progénitrices CD34^{+149,150}. La combinaison unique de GM-CSF et d'IL-4 semble toutefois suffisante pour la production de DC¹⁵¹. Chacune des cytokines a un rôle précis : le GM-CSF agit sur les cellules progénitrices et induit leur différenciation ainsi que leur survie¹⁵². Le TNF- α augmente considérablement la prolifération des cellules CD34⁺ en présence de GM-CSF ou d'IL-3 et induit la maturation des DC¹⁵³. Finalement, l'IL-4 augmenterait la pureté des DC produites en prévenant la différenciation en macrophages et en stimulant la conversion de macrophages en DC¹⁵⁴. Cette combinaison de cytokines produit des DC dites immatures (non activées). C'est le traitement avec le TNF- α qui est nécessaire pour obtenir des cellules présentatrices d'antigènes matures¹⁵⁵. Le TNF- α peut être remplacé par d'autres agents activateurs des DC notamment le CD40L, le LPS ou d'autres agonistes du TLR4^{156,157}.

1.6.2.2. FLT3-Ligand (FL)

L'administration de FL à des souris ou des humains augmente significativement le nombre de DC au niveau du sang¹⁵⁸. Ces DC sont fonctionnels et peuvent stimuler efficacement des cellules T en réaction mixte lymphocytaire^{159,160}. Le mécanisme précis par lequel le FL

augmente le nombre de DC demeure toutefois obscur. Par contre, il semblerait que le FL pourrait agir en accélérant la différenciation des cellules progénitrices et/ou en monopolisant les cellules souches hématopoïétiques commises préexistantes pour les faire différencier en DC. Le FL pourrait aussi agir en synergie avec le TGF- β pour promouvoir la différenciation *in vitro* des CSH en DC dans un milieu de culture sans sérum¹⁶¹. Chez la souris, la culture de cellules progénitrices avec du FL permet la production de DC qui expriment le récepteur CD11c. Ces populations se divisent en deux catégories distinctes selon l'expression du récepteur CD11b : DC lymphoïdes et DC myéloïdes¹⁶². Comparativement aux GM-CSF, IL-4 et TNF- α , le FL permettrait la génération de DC matures ayant une présentation antigénique normale. Curieusement, les DC générées avec du FL favoriseraient une réponse immunitaire de type TH1 alors que celles générées avec du GM-CSF favoriseraient une réponse immunitaire de type TH2. Appuyant donc la thèse selon laquelle les DC formées par le FL seraient distinctes de celles générées à partir du GM-CSF¹⁶³.

1.6.2.3. IL-3

L'interleukine-3 seule ne suffit pas à la génération de DC. Par contre, lorsque combinée au TNF- α ¹⁶⁴ ou au CD40L¹⁶⁵, elle induit la production de DC à partir de cellules progénitrices CD34⁺. Les DC produites *in vitro* en ajoutant de l'IL-12 et de l'IFN- γ possèdent un phénotype DC1 alors que les cellules cultivées en présence d'IL-4 possèdent un phénotype DC2. Les DC de type 1 (DC1) ont une capacité supérieure à celle des DC2 à stimuler les cellules T dans une réaction mixte lymphocytaire¹⁶⁶. *In vivo*, l'injection de GM-CSF et d'IL-3 augmente considérablement le nombre de DC qui ressemblent aux pDC et qui produisent de l'IFN-. Ces DC possèderaient aussi une activité antitumorale élevée via la présentation croisée pour activer des lymphocytes T CD8⁺¹⁶⁷.

1.6.2.4. *Monocyte colony stimulating factor* (M-CSF)

Le facteur de croissance M-CSF en combinaison avec l'IL-4 et le TNF- α permet la différenciation des cellules progénitrices CD34⁺ en DC. Par contre, les niveaux de DC produits sont relativement faibles par rapport à ceux obtenus avec le GM-CSF¹⁶⁸. Le M-CSF en combinaison avec l'IL-6 entraîne aussi un défaut de maturation des DC, ce qui empêche leur génération à partir de cellules souches progénitrices CD34⁺¹⁶⁹.

1.6.3. Mécanismes d'activation des DC

1.6.3.1. Facteurs solubles importants pour la maturation et l'activation des DC

L'ajout de certaines cytokines aux combinaisons GM-CSF, IL-4 et TNF- α peut polariser les DC en culture *in vitro*. L'IL-7 aiderait à la différenciation des monocytes ainsi que des CLP résidents dans le thymus à se différencier en DC^{170,171,172}. Ces DC exprimeraient davantage le CMH et auraient une capacité supérieure à activer les lymphocytes T (jusqu'à 1 à 2 log supérieurs) comparativement aux DC retrouvées dans le sang.¹⁷³

L'IL-2 permettrait d'augmenter considérablement la motilité des DC *in vitro* et *in vivo*. Le traitement à l'IL-2 entraînerait l'accumulation des DC au niveau des poumons et de la peau¹⁷⁴. L'IL-6 entraîne une diminution importante de la production de DC. Par contre, son utilisation en combinaison avec le GM-CSF, le SCF(*stem cell factor*) ou le FL permettrait de différencier les cellules CD34⁺ en DC matures^{175,176,177}. L'IL-12 seule ou en combinaison avec du FL entraînerait une accumulation de DC myéloïdes au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques, du thymus, du foie et des tissus tumoraux¹⁷⁸. Son utilisation augmenterait aussi significativement l'expression du CMH II¹⁷⁹.

L'IL-13 pourrait substituer l'IL-4 dans la génération *in vitro* de DC et favoriserait la génération de DC dérivés des monocytes (moDC)^{180,181}. L'IL-15 augmenterait l'expression des molécules de costimulation CD80/86, CD40. Elle entraînerait aussi une diminution de l'apoptose et une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2. L'ajout d'IL-15 augmente considérablement la capacité des DC à stimuler les lymphocytes T^{182,183,184}. Elle permettrait aussi d'augmenter la phagocytose ainsi que la production d'IL-12, de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) et de TNF- α par les DC¹⁸⁵.

Le TGF- β (*tumor growth factor* beta) endogène est essentiel pour le développement des cellules de Langerhans (LC). Les DC non-LC sont indépendantes du TGF- β pour leur maturation. Ces DC démontreraient par contre une diminution de l'expression du CMH II¹⁸⁶.

1.7. Le rôle des DC dans l'effet GVH

Des études murines ont démontré que la GVHa serait déclenchée par des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques activés par les CPA du receveur et maintenue par ceux du donneur. Les lymphocytes T CD8⁺ ont besoin des CPA du receveur pour déclencher la GVH. De plus, les CPA du donneur ne feraient qu'amplifier la GVH déjà présente^{187,188,189}. Les LC, des DC retrouvées principalement au niveau d'épithéliums cutanés et intestinaux, seraient responsables de l'apparition de la maladie au niveau de l'intestin et de la peau, même si certaines expériences semblent remettre ces résultats en question^{190,191}.

Le rôle des CPA dans la GVHc est moins bien compris, principalement en raison de disparités de la maladie (GVHc de novo ou suite à une GVHa). Par ailleurs, l'hétérogénéité des symptômes cliniques empêche grandement sur la compréhension du rôle des CPA dans la maladie. Certaines études démontrent que les CPA du donneur et du receveur peuvent être

impliquées, mais que cela dépend de l'organe atteint. Par exemple, la GVHc peut être causée par les CPA du donneur et du receveur de façon générale, alors que les CPA du donneur semblent prédominer en GVHc intestinale^{192,193}. Deux voies distinctes semblent impliquées dans l'apparition des CD4⁺ alloréactifs qui causent la GVHc, soit la voie thymus-dépendante et la voie thymus indépendante. La voie thymus dépendante serait associée à une fonction thymique résiduelle avec une altération de la sélection négative des thymocytes. Des études chez la souris ont en effet démontré que l'évolution de la GVHa aiguë vers la forme chronique de la maladie serait causée par des dommages thymiques induits par des lymphocytes T CD8⁺. Ces dommages empêcheraient la sélection négative des thymocytes par les DC du thymus, générant donc des lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs. Ceci pourrait expliquer pourquoi le KGF (*Keratinocyte growth factor*) aurait un rôle protecteur contre la GVHc puisqu'il serait impliqué dans la restauration et le maintien de l'épithélium thymique chez la souris¹⁹⁴.

1.7.1. Les cellules dendritiques de l'hôte et du donneur

Les CPA du receveur jouent un rôle essentiel afin d'activer les cellules T du donneur¹⁹⁵. La présentation de miHA du receveur présenté par ses DC constitue la voie directe de présentation antigénique impliquée dans l'initiation de la réponse alloréactive anti-receveur^{196,197}. Il existe aussi une voie indirecte de présentation antigénique où les DC du donneur vont présenter les miHA du receveur et ainsi contribuer à la GVHa¹⁹⁸. Les antigènes associés aux tumeurs, qui sont des protéines souvent identiques à celles retrouvées dans les cellules saines, mais en quantité aberrante ou modifiée par des mutations, aux tumeurs sont généralement présentés par les DC du receveur. Finalement, il existe la voie semi-directe où les cellules T du receveur reconnaissent les molécules du CMH du receveur qui sont retrouvées à la surface des cellules du donneur par un processus appelé « nibling »^{199,200}.

1.7.2. Cellules dendritiques tolérogéniques (tolDC)

Les DC auraient la capacité d'adapter leur fonction selon le milieu extracellulaire dans lequel elles baignent²⁰¹. Alors que les DC immunogéniques induisent le développement de cellules T effectrices, les DC tolérogéniques seraient plus aptes à favoriser le développement des Treg²⁰². Les DC du donneur joueraient un rôle essentiel dans l'induction de la tolérance puisque les cellules T nécessitent deux signaux pour s'activer : un signal provenant du TCR et un signal de costimulation. La génération de DC immatures qui possèdent des niveaux faibles de molécules de costimulations et de CMH permettrait alors de maintenir la tolérance immunitaire chez les patients ayant reçu une greffe de CSH allogénique²⁰³. *In vitro*, l'utilisation de DC immatures dérivées de la moelle osseuse favoriserait l'anergie des cellules T^{204,205,206} et la formation de Treg^{207,208}. Il est important de préciser que certaines sous populations de DC matures ont une capacité accrue d'induire l'expansion des cellules régulatrices CD4⁺ même en absence d'IL-2²⁰⁹. Contrairement aux DC immatures, ces DC matures auraient un rôle actif dans le maintien de la tolérance immunitaire et possiblement auraient un rôle clé dans l'atténuation de la GVH^{210,211}.

1.7.3. Le rôle des DC dans l'effet GVL

Il a été proposé que différentes populations de DC étaient possiblement responsables de la ségrégation entre l'effet GVH et GVL²¹². Dans les cas d'une greffe de CSH HLA compatible, les DC qui portent à leur surface des antigènes mineurs d'histocompatibilité exprimés de façon ubiquitaire seraient responsables de l'effet GVH. Par contre, les DC qui présentent des antigènes mineurs restreints au système hématopoïétique seraient en grandes parties responsables de l'effet GVL (figure 2)²¹³. Dans cet optique, l'injection de DC préincubés *in vitro* avec des antigènes associés aux tumeurs (TAA) augmenterait l'effet GVL sans toutefois affecter la GVH^{214,215}. Au niveau clinique, il semble qu'une diminution du nombre de DC, particulièrement les DC

myéloïdes, serait associée à une augmentation des rechutes leucémique²¹⁶. D'autres études ont confirmé que le rôle des DC dans l'effet GVL était dû à leurs effets sur les lymphocytes T.

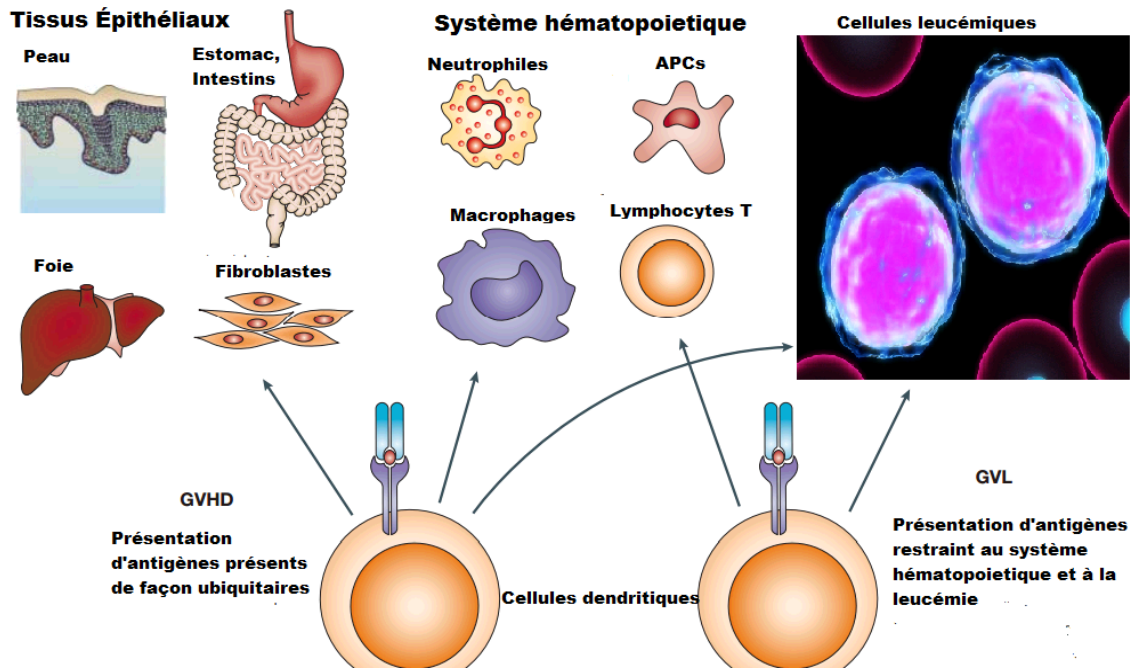


Figure 2: La différence entre l'effet GVL et GVH est ségréguée par le type d'antigènes mineurs présenté par les cellules dendritiques lors de la stimulation des cellules T. Inspiré de Nature Review : cancer (2004) Nature publishing group

2. Hypothèse et objectifs

2.1. Objectifs et hypothèse

2.1.1. Hypothèse: L'absence de cellules dendritiques leucémiques avant une greffe de moelle osseuse allogénique représente un facteur de risque à la rechute leucémique pour des patients avec une leucémie myéloïde chronique.

2.1.2. Objectifs

1. Évaluer le nombre de cellules dendritiques avant la greffe chez des sujets LMC.
2. Évaluer l'impact clinique suite à la greffe en fonction du nombre de cellules dendritiques énuméré avant la greffe de moelle osseuse allogénique.
3. Évaluer la reconstitution immunitaire des cellules dendritiques suite à une greffe de moelle osseuse allogénique.

3. Article

3.1. Loss of progenitor diversity is associated with diminished production of bcr-abl⁺ dendritic cells and shorter survival in transplanted CML patients.

Absence of bcr-abl⁺ dendritic cells in CML patients is due to the loss of progenitor diversity and directly impacts patient outcome.

Stephanie Thiant^{2,4*} Philippe Laflamme^{2,4*} Radia Sidi Boumedine¹, Simon-David Gauthier^{2,4}

Dominique Leboeuf¹ and Martin Guimond^{1,2,3}.

* Co-First Author.

RUNNING HEAD: Skewing of CD34⁺ cells constrains DC generation.

KEYWORDS: Chronic myelogenous leukemia, dendritic cells, bcr-abl, homeostasis, immunotherapy

ABBREVIATIONS: CML, chronic myelogenous leukemia, GM-CSF: Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor, APCs; antigen presenting cells

Word count for text: 3070

Word count for abstract: 143

Figure count: 5

Reference count: 4

ABSTRACT

The robustness of the immune response generated by dendritic cells (DCs) has positioned these cells as central mediators of T cell activation. The sensitivity of CML cells to immune interventions likely results from the capacity of leukemia-derived DCs to directly present peptides from leukemic CML precursors to T lymphocytes. Here we show that most CML patients prior to allogeneic SCT present an important deficit in DCs in their blood and bone marrow. Low levels of circulating DCs were associated with severe skewing of CML BM CD34⁺ progenitors and limited DC production in vitro. Finally, we found that low DC counts prior to allogeneic stem cell transplantation were significantly associated with decreased overall survival and increased incidence of graft-versus-host disease. Thus far, our study suggests that DC counts prior to allogeneic SCT could serve as a prognostic marker to predict outcome in transplanted CML patients.

INTRODUCTION

Strategies to harness the capacity of immune cells to identify and selectively eliminate cancer cells have rejuvenated the concepts of adoptive immunotherapy and tumor vaccines.¹⁻⁶ Among cancers, CML probably represents the paradigm of immune surveillance since the ability of T cells to recognize and eliminate such malignant cells has led to curative applications in stem cell transplantation.⁷⁻¹⁰ The clinical role of T cells was identified more than 20 years ago, when fluctuations in the number of CML cells followed modulation of immune suppression after allogeneic transplantation, and patients receiving T cell-depleted allografts demonstrated an increased incidence of relapse.¹¹ Moreover, hematologic, cytogenetic and even molecular remissions were observed upon emergence of graft-versus-host disease (GVHD).¹² Importantly, such a response was also observed in patients failing to display any sign of anti-normal host cell response,¹³ suggesting that tissue-restricted host minor histocompatibility antigens (MiHA), differentiation antigens or leukemia-specific epitopes present on all CML cells could be targeted.^{8,14,15} Finally, the fact that leukemia cells can be eliminated by reinfusion of donor lymphocytes, without additional chemotherapeutic intervention, confirms the crucial role of immune cells and demonstrates that CML-naïve donor T cells can be primed and expanded into cytotoxic effector cells.^{9,12,16-18}

The magnitude of the immunostimulatory reaction generated by DCs has positioned these cells as central mediators of primary T cell-dependent immune response.¹⁹⁻²¹ Although initially scarce, DC precursors demonstrate a unique capacity to proliferate and differentiate into potent antigen presenting cells (APCs) when exposed to the appropriate combination of early acting cytokines.^{20,22,23} Interestingly, CML-specific *bcr-abl* fusion peptides on the surface of DC cells have been shown to induce peptide specific major histocompatibility complex class I and II restricted T cell immune responses.²⁴⁻²⁸ Since CML cells are able to transform into DCs and present their own immunogenic peptides, then why do these malignant precursor cells escape immune recognition?^{2,29-33} Several hypotheses can be raised to explain the outgrowth of CML cells: (i) inadequate antigen presentation through DCs, (ii) defective DC-T cell interactions, or (iii) impaired T cell proliferation and effector mechanisms. Interestingly, some

investigators have noted a correlation between the number of DCs and the level of circulating CD34⁺/CD38⁺ cells in the blood,^{2,31} which might indicate that these malignant cells are perhaps recognized and eliminated by immunoreactive cells. On the other hand, it is possible that the disease itself could affect the normal distribution of hematopoietic progenitors. The present study was performed to clarify the impact of CML disease on the production of high numbers of immunogenic DCs expressing bcr-abl. We found that CML DCs can be generated from CD34⁺ but their numbers were greatly reduced in most CML patients. The diminished production of DCs from CD34⁺ precursors was not ascribed to a selective elimination of DC precursors but rather to a severe skewing of bone marrow progenitor cells favoring the accumulation of mature committed progenitors at the expense of their more immature counterparts. Finally we found that patients with few CD11c⁺ DCs in their blood were more susceptible to develop GVHD and/or die after allogeneic stem cell transplantation.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patient population and clinical samples. Patients with CML (n=25) and healthy volunteer donor (n=25) samples were obtained under protocols approved by the HMR Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients and healthy donors in accordance with the Declaration of Helsinki. Patient and donor characteristics are summarized in Table 1. Three patients did not receive HSC transplantation. Bone marrow (BM) and/or peripheral blood (PB) samples were collected in preservative-free heparin and mononuclear cells (MNC) separated by ficoll-hypaque density gradient centrifugation (Ficoll-Paque; Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). Cells were cryopreserved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) using standard techniques and stored in the vapor phase of liquid nitrogen until utilization.

Cell purification. CD34⁺ cells were isolated from BM samples using immunomagnetic beads according to manufacturer's instructions (Dynabeads M-450 CD34, Invitrogen, Burlington, Can.). Briefly, mononuclear cells were incubated with anti-CD34 coated beads for 30 min at 4°C, washed and selected. Magnetic

beads were removed from the surface of selected cells by incubation with DetachaBead buffer for 10 min at 37°C.

Monocytes were isolated from PBMC by plastic adherence. For monocyte isolation by plastic adherence, 5×10^6 PBMC per well were distributed into 12-well plates (Costar, Corning, NY, USA), and allowed to adhere in a 5% CO₂ incubator at 37° for 2 hrs in RPMI-1640 containing 10% fetal calf serum. Non-adherent cells were removed by washing adherent cells. Adherent cells were recovered by incubation with ice cold PBS and gentle scraping with a cell lifter.

Expansion of DCs in liquid culture. Purified CD34⁺ cells and adherent CD14⁺ monocytes were adjusted to 1×10^5 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Sigma, St-Louis, MO), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all from Gibco, Grand Island, NY) and grown in 24-well plates in the presence of human recombinant cytokines: GM-CSF (800 U/ml), a kind gift from Genetics Institute (Cambridge, MA, USA), IL-4 (10 U/ml) and TNF (50 U/ml) (Genzyme, Cambridge, MA, USA). Cytokines were replenished every 2 days by removing half of the medium and adding back fresh medium supplemented with cytokines. When confluence was reached, wells were split in two. Cells were serially sampled at days 5, 7, and 10 for adherent CD14⁺ cells, and days 5, 10, 15 and 20 for CD34⁺ cells to perform cell count and immunophenotypic analysis.

Flow cytometric analysis and cell sorting. DC surface antigen expression was evaluated by direct immunofluorescence staining using standard techniques. The monoclonal mouse anti-human antibodies used were phycoerythrin (PE) conjugated: CD1a; or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated: CD54, CD58, CD80, CD11a, CD11b, CD16, HLA-ABC and HLA-DR (Coulter Immunology, Hialeah, FL), and CD40, CD50, CD86 (ID Lab, Toronto, Can.). PEcy7 conjugated: BDCA-1, CD19, FITC conjugated BDCA-2, PE conjugated BDCA-3, Alexa Fluor 647 conjugated CD11c, APCcy7 conjugated CD14, and Pacific Blue

conjugated HLA-DR were used to evaluate DCs. (Biolegend, San Diego, US). Non-specific binding was determined using appropriate isotypic controls. Immunofluorescence reactivity was determined using multi-parameter flow cytometry, analyzing between 10^4 and 10^6 cells in each sample (FACScan and LSR II, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), and processed using Cellquest (Becton Dickinson) or FlowJo (Treestar, Ashland, OR, USA). The percentages and absolute number of DCs were calculated based on lymphocytes and monocytes gating.

CFSE dilution analysis. CD34⁺ selected cells were stained with 5 μ M CFSE for 15 min at 37°C, washed, then incubated for 18 hrs at 4°C in Iscove's modified Dulbecco medium (Gibco) supplemented with 20% FCS. CFSE labeled cells were then cultured in RPMI 10% FCS supplemented with GM-CSF, IL-4 and TNF- α as described previously. CFSE dilution was analyzed on days 0 and +5 using flow cytometry.

Colony forming cell (CFC) assays. Cell samples were plated in methylcellulose medium (MethoCult H4434; StemCell Technologies Inc, Vancouver, Can) according to the manufacturer's instructions. Colonies were scored and classified after 14 days of culture using an inverted microscope (Leitz, Labovert FS). Classification consisted of colony-forming-unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM $<$ or $>$ 500 cells) or colony-forming-unit-erythroid (CFU-E) and burst-forming-unit-erythroid (BFU-E \leq or $>$ 8 clusters) as well as colony-forming-unit-mix (CFU-Mix).

Fluorescent in situ hybridization (FISH). Cells were cytopun onto slides and evaluated for presence of *bcr-abl* as described previously.³⁴ The *bcr-abl* fusion gene was identified in interphase nuclei by dual-fusion fluorescence in situ hybridization (D-FISH) using a mixture of *bcr* probe directly labeled with rhodamine, and *abl* probe directly labeled with FITC (Oncor, Gaithersburg, MD, USA). This probe mixture displays a fluorescent "fusion" signal on both derivative chromosomes 9 and 22 (Philadelphia chromosome or Ph⁺). At least one hundred cells were evaluated for each sample under a fluorescent

microscope equipped with a triple-bandpass filter (S1900; Omega Optical, Brattleboro, VT) for diamino-phenylindol (DAPI)/FITC/Texas Red. The detection threshold for Ph⁺ cells under this protocol is 2%.

PCR analysis. IL-4 receptor (IL-4R) detection was performed on freshly isolated and cultured CD34⁺ cells from day 0 to day 5. Total RNA was isolated from cells as described previously.³⁵ Reverse transcription was performed by first heating 1 µg total RNA at 70°C for 5 minutes then using the heated RNA with random hexamers as reaction primers. The reaction was carried out at 42°C for 45 minutes in the presence of 12 units of avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase. Positive controls consisted of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primer for amplification of housekeeping mRNA. Primers for IL-4 receptor amplification were the following: Fwd 5-GGAAGAGGGGTATAAGCCTTT-3 and Rev 5-CACGGAGACAAAGTTCACGAT-3.³⁶

Statistical analysis. Comparisons between groups were performed using the Mann–Whitney U test and correlations were obtained using the Spearman’s R coefficient of concordance, as appropriate. For Kaplan–Meier survival estimation, we stratified patients into 2 groups; high and low DC value. Thirty percent of the normal mean value was used as a cut off for high and low DCs. Differences between strata were evaluated using a Log-rank test. Multivariate analyses using Cox proportional-hazards models were performed using a P-value of 0.05 for the inclusion and exclusion of variables. Analyses were performed with SPSS software (SPSS v11.5, Chicago, IL, USA) and Graphpad Prism 5.0 Software.

RESULTS

Low DC numbers in the blood of CML patients. Previous studies have suggested abnormal lower DC counts in the blood of some CML patients.³⁷ Given the critical role of these cells in GVL effect, we studied DC subsets in blood samples of CML patients prior to the conditioning regimen and allogeneic SCT and compared them to healthy controls. The percentage and the absolute number of DCs in the blood of CML patients before SCT was significantly diminished compared to normal controls (Figure 1a-b). Surprisingly, we did not find any correlation between the status of disease and the percentage ($P=0.8315$) or the absolute number of DC ($p=0.3328$) at the time of analysis. Specifically, CML patients had lower percentage and absolute number of pDCs, mDC1, mDC2 and mDC3 compared to normal controls (Figure 1b-c). In contrast, monocytes were generally increased in comparison to normal controls (supplemental data Figure 1). Thus far, our data indicate that DCs in general are diminished in the blood of CML patients prior to SCT.

Blood DCs prior to allogeneic SCT and clinical outcome. Because residual CML DCs that survive chemotherapy can potentially prime donor T cells after allogeneic SCT, we evaluated the clinical significance of diminished DCs in CML patients prior transplantation. For this purpose, we considered 2 distinct groups of patients: normal (DC value above 30% of the normal mean value) and low DCs (DC value below 30% of the normal mean value) for each separate DC subset (pDCs, mDC1, mDC2 and mDC3) and CD11c⁺ DCs in general. Survival of transplanted CML patients was evaluated using Kaplan-Meier survival curves according to DC percentage. Interestingly, patients with low levels of CD11c⁺ DCs before SCT were more likely to die after allogeneic SCT. Further, we found mDC1 levels to be the most predictive value for survival after SCT (Figure 2a). The use of multivariate Cox regression analysis to evaluate all known/suspected risk factors (aGVH, cGHV, CMV reactivation and levels of pDC, mDC1 and mDC2), confirmed an association between mDC1 levels and diminished survival after allogeneic SCT:

hazard ratio (HR)= 0.189; 95% confidence interval (CI): 0.034–1.049; $P=0.05$ (overall model fit: $P=0.034$). We then divided CML patients based on GVHD status or relapse occurrence and evaluated DC values prior to SCT. Interestingly, patients who develop acute GVHD presented fewer peripheral blood pDCs ($P=0.0317$), mDC1 ($P=0.0447$) and mDC2 ($P=0.0092$) compared to patients without acute GVHD (Figure 2b-c). However, when all known risk factors were taken in consideration (sexmismatch, CMV reinfection), low levels of DC in general represented the major predictive factor for developing acute GVHD after SCT: hazard ratio (HR)= 0.113; 95% confidence interval (CI): 0.012–1.091; $P=0.05$ (overall model fit: $P=0.023$). We also studied chronic GVHD but did not find any difference in DCs according to cGVHD status (figure2b). Finally, patients relapsing after SCT tend to have fewer DCs, but the low number of patients in this group ($n=3$) may explain why statistical significance was not reached for this factor. Thus far, our data indicate that mDC1 counts prior to allogeneic SCT represents a predictive biomarker for overall survival after transplantation in CML patients while low DC counts in general may predispose to aGVHD.

Decreased in vitro production of DCs from CML CD34⁺ cells. In humans with CML, leukemic progenitors generally conserve their ability to differentiate into different cell types, yet granulocytes are typically overrepresented whereas T lymphocytes are rarely bcr-abl⁺. To determine if leukemic progenitors can still differentiate normally into DCs, CD34⁺ cells were enriched from the bone marrow of 10 CML patients and cultured in liquid suspension in the presence of GM-CSF, IL-4 and TNF- α . After 5, 10, 15 and 20 days in culture, DCs recovered from CML progenitors were compared to DCs generated from control CD34⁺ cells obtained from 7 healthy individuals. After 5 days in culture, CD1a⁺ cells represented a large proportion of plated control CD34⁺ cells but were almost undetectable among CML progenitors (Figure 3a). Although prolonging the culture period to 10 and 15 days raised the proportion of CML DCs above 10%, we observed further enhancement of the expansion gap between CML patients and healthy controls.

To ensure that CML DCs were not underestimated because of dilution among other rapidly expanding cell populations, DC numbers were measured according to the CD34⁺ cell input. In this context, an average of only $0.3 \pm 0.1 \times 10^4$ (n=10) CD1a⁺CD14⁺ DCs were recovered in CML samples, while $2.9 \pm 0.3 \times 10^4$ (n=7) CD1a⁺CD14⁺ DCs were generated in healthy controls after only 5 days in culture ($p < 0.001$) (Figure 3b). Although the number of CML DCs increased in most instances over the subsequent 5 days of culture, the mean number of DCs for CML patients after 10 days of culture was still 4.7-fold lower than that achieved by healthy individuals ($p < 0.005$). Because this discrepancy could be attributable to delayed DC generation in the CML group, the culture period was prolonged to 20 days. At day 15, CML patients demonstrated two distinct patterns of growth: (i) a predominant profile consisting of slowly increasing DC numbers that remained consistently lower than healthy individuals [Day 15: CML (n=8) = $0.5 \pm 0.1 \times 10^5$ vs control = $2.2 \pm 0.4 \times 10^5$ ($p = 0.0007$)] (Figure 3c); and (ii) a delayed exponential growth curve resulting in greater CML DC expansion after 20 days of cell culture compared to healthy controls [Day 20: CML (n=2) $25.8 \pm 10.1 \times 10^5$ vs control $2.7 \pm 0.3 \times 10^5$] (Figure 3d). Interestingly, patient CML 10 was among the two patients producing the highest number of DCs by CD34⁺ cells by the end of DC culture and consistent with this finding, we found an increased proportion of mDC1 and mDC2 cells in this patient's peripheral blood (Figure 1a). We also analyzed blood samples from CML patients in which few DCs were generated *in vitro* (CML 4, CML 5 and CML12) and also found diminished DC levels. Thus far, these results identify a deficit and/or delay in the generation of DCs from CD34⁺ cells that could explain low numbers of peripheral blood DCs found in some CML patients.

Lack of interference of bcr/abl⁺ on the differentiation of leukemic DC precursors. The low number of DCs generated from leukemia CD34⁺ progenitor cells prompted us to assess the capacity of DC precursors to proliferate and expand normally. To address this, we first compared the total cell growth kinetics of CD34⁺ cells from CML patients to that from healthy controls. While few CD1a⁺ cells could be

generated from CML CD34⁺ cells during the first 10 days in culture, the total number of cells increased gradually and was similar in CML and control samples at days 5 and 10, confirming that CML CD34⁺ cells could proliferate and expand (Figure 4a). To confirm that cell increase did not result from the brisk proliferation of a few CD34⁺ progenitor cells; we also measured CD34⁺ cell divisions after CFSE labeling and confirmed that most of the CD34⁺ cells diluted their CFSE content within 5 days of cell culture (Figure 4b).

Since CML CD34⁺ cells appeared to divide normally, we asked whether leukemic CD34⁺ progenitor cells could still undergo differentiation. We first analyzed the down modulation of CD34 antigen during culture of CML and control CD34⁺ cells. Interestingly, a higher proportion of CML CD34⁺ cells in comparison to control retained CD34 antigen expression whereas very few CML cells acquire CD1a antigen when cultured with GM-CSF, IL-4, and TNF- α (Figure 4c). To evaluate the possibility of bcr/abl-mediated interference in the differentiation program of CML cells, we next examined the ability of bcr/abl⁺ monocytes to differentiate into bcr/abl⁺ DCs but could not find any difference in DC numbers generated from CML patients and controls. (Figure 4d). FISH analysis confirmed that the proportion of bcr/abl positivity was also identical in CD34⁺ and CD14⁺ cells as well as in CD1a⁺ cells from both origins (Figure 4e). Therefore, all of these findings support the assertion that the bcr/abl rearrangement does not interfere with the capacity of leukemic precursors to differentiate into leukemic DCs.

The low DC yield in CML patients correlates with severe skewing of the clonogenic fractions of CD34⁺ progenitor cells. Healthy hematopoietic progenitor cells can produce the whole spectrum of hematopoietic and immunologic elements, and CML progenitors are recognized, among hematologic malignancies, for their immaturity. However, CML progeny is known to fail to completely reproduce the anticipated array of mature cells found in healthy individuals, T cells being mostly bcr/abl negative. This observation prompted us to investigate whether an abnormal distribution of CML bone marrow progenitors could explain the defective DC production from CML samples. We analyzed the distribution

of clonogenic hematopoietic progenitors found in CML patients and compared it to healthy controls. In CML patients, the mean numbers of immature granulocyte-monocyte colonies (GM) > 500 and mix colonies were statistically diminished compare to normal controls (Figure 5a). While the proportion of erythroid and myeloid progenitors is usually balanced in healthy individuals, skewing in favor of erythroid (CML 2 and CML7) or granulocyte progenitors (CML 5 and CML8) was observed in CML samples, supporting a prominent DC generation defect (Figure 5c). Interestingly, CML2, CML5 and CML8 patients, who were part of the subset with the lowest DC yield, showed almost complete skewing of myeloid progenitors toward mature CFU-GM, with large or complete absence of CFU-Mix colonies (Figure 5c). In contrast, CML9, where DCs generated *in vitro* were above average by day +20 of cell culture, showed high levels of CFU-Mix colonies (Figure 5d). When DCs generated were evaluated according to the number of CFU-Mix and immature CFU-GM, we found a direct correlation with both types of more immature progenitors (R=0.91 and 0.95, respectively) (Figure 5b). Altogether, these data demonstrate that bone marrow composition and distribution of hematopoietic progenitors is abnormal in several CML patients and this likely explains why fewer DCs are produced from CML CD34⁺ cells. Furthermore, it explains why CML patients generally have lower levels of DCs in their blood.

DISCUSSION

There are substantial evidences that leukemia CD34⁺ precursors can be transformed into the most potent antigen-presenting cells, i.e. DC, and present peptides from clonogenic cell subsets to cytotoxic effector T cells.^{24,28,29} This by itself could explain why the GVL effect observed after allogeneic SCT can efficiently cure CML disease in several patients. In this setting, residual CML DCs escaping chemotherapy could serve to prime donor T cells and initiate GVL. However, if residual DCs are decreased at the time of allogeneic stem cell transplantation, this could considerably diminish the GVL effect. Therefore we postulated that these patients might be at higher risk to relapse. Interestingly, we demonstrated a correlation between the number of DCs prior to SCT and the overall survival after allogeneic SCT (Figure 2a). Surprisingly the number of relapses was relatively modest among patients with few DCs despite our finding of a strong association between DC levels and overall survival. Given that monocytes were generally increased in several CML patients (Supplementary Figure 1), this could explain why disease recurrence remained relatively low. There is also substantial evidence that tissue DCs can persist for some time after SCT and that these cells could potentially constitute another source of leukemia antigens to prime donor T cells. However, DC progenitors in the marrow are sometimes severely diminished and therefore, it is possible that skin DCs might also be diminished. The presence of pDCs within the graft has been associated with a low incidence of aGVHD³⁸ and in this study we showed that most CML patients experiencing GVHD had fewer pDCs before SCT. Whether recipient pDCs in this settings can impact GVHD remains unknown. Thus far, low DC counts prior to allogeneic SCT are associated with poor overall survival and GVHD. Given the limited number of patients included in this study, this possibly explains why relapse among patients with low DC counts did not reach significance. A larger cohort of transplanted CML patients will be necessary in order to fully understand the association between low DC counts and survival.

In the present study, we investigated several mechanisms to explain CML patient refractoriness in generating DCs. A functional proliferative defect in CD34⁺ progenitors was excluded as CD34⁺ stem cells exposed to DC growth factors could dilute their CFSE and increase in total cell numbers. However, the failure of most CML patient cells to attain the total cell numbers reached at day 20 by healthy controls could imply premature mortality or terminal differentiation of leukemia cells.³⁹ Among the growth factors used to generate DCs, only IL-4 has been shown to block monocyte differentiation and redirect cells toward DC differentiation.^{20,44} Thus, we were concerned that the low DC yield in CML samples could reflect a deficiency in IL-4R expression. However, we found IL-4R to be inducible, and increasing IL-4 concentration by a 100-fold failed to enhance DC production (Supplementary Figure 2). We also confirmed the lack of interference of bcr/abl transcripts on the differentiation of DC precursors, as both CD34⁺ and CD14⁺ precursors give rise to similar percentage of translocated cells in DCs.⁴⁰

To investigate the possibility that CD34⁺ precursors with DC differentiation potential were unavailable because of rerouting toward other lineages, we measured the distribution of hematopoietic progenitors among CML CD34⁺ cells. The almost complete absence of immature CFU-Mix colonies, the decreased proportion of immature CFU-GM (>500) and the increased proportion of more mature CFU-E and CFU-GM in CML patients all indicate skewing of CML progenitors toward more mature and committed progenitor cells. These observations also point to a CD34⁺ DC precursor that is different from mature CFU-GM (<500). Nonetheless, 2 CML patients (CML9 and 10) exhibited a distinct pattern of DC growth with an important increase in DC numbers by the end of cell culture, i.e. 15 and 20 days. Analysis of hematopoietic progenitors in CML 9 demonstrated an increased proportion of CFU-Mix colonies corresponding to an increased proportion of mDC1 and mDC2 found in the blood of this patient. Taken together, these results indicate that skewing of CD34⁺ cells toward erythroid or committed myeloid

progenitors (CFU-E and mature CFU-GM) constrains the early production of DCs (i.e. after 5 to 10 days of cell culture). Moreover, they underline the importance of immature CFU-Mix progenitor cells for sustained DC production. Thus far, our results indicate that CD34⁺ DC precursors are functional and present in most CML patients and that they can give rise to DCs but their numbers is greatly reduced in most patients because of an important skewing within the bone marrow progenitor compartment.

Our findings have several clinical implications. First, we identified a severe skewing of hematopoietic progenitors in CML patients that limits the production of DCs. The severity of the skewing of the CD34 compartment likely explains the diminution in other immune cells such as B lymphocytes, NK and T cells (Supplementary Figure 3). Interestingly, it is well known that NK cells can decline in number during the course of CML⁴¹ and according to our results, this could be explained by an incapacity of the marrow to produce these cells. Given the central role of DCs in NK cell homeostasis, such decline in DC production could have an adverse impact on mature NK cells in the periphery.⁴² Furthermore, DCs play a critical role in immune surveillance and T cell homeostasis, and disruption of the DC network is also likely to have an adverse effect on T cell immunity and homeostasis in general.⁴³ Diminished clonal diversity in T lymphocytes has also been documented during the chronic phase of CML,⁴⁴ indicating that loss of DCs in the periphery possibly exerts a selective pressure on the T cell repertoire. Since thymopoiesis is greatly reduced in aging individuals, restoring DC production in CML patients may be crucial to maintain the highest degree of TCR diversity and preserve some degree of immunocompetence. The critical role of DCs in tumor immunology is well known, it is possible that deregulation of DC production in CML patients may be part of the strategy used by CML cells to evade the immune system and avoid immune recognition by T lymphocytes. The data presented in our study lend support to this notion. It will be important to further investigate the skewing of CML progenitors as well as underlying mechanisms described above in order to identify high risk patients after treatment with allogeneic stem cell transplantation.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Denis-Claude Roy for providing CML samples. In addition, the authors thank Mrs. Chantal Baron and Marylène Corriveau for their help with patient samples processing and Jean Morin for clinical data

Statement of Author Contributions

Stephanie Thiant: Analyzed data, performed statistical analysis, wrote and reviewed the manuscript.

Philippe Laflamme: Designed and performed experiment, analyzed data.

Radia Sidi Boumedine: Performed experiments.

Simon-David Gauthier: Analyzed data and reviewed the manuscript.

Dominique Leboeuf: Analyzed data and reviewed the manuscript.

Martin Guimond: Designed and wrote the manuscript.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

Figure Legends

Figure 1. Evaluation of DC proportions in CML blood samples. (a) Flow cytometric analysis of pDCs, mDC1 and mDC2 from blood samples of CML patients before allogeneic SCT, gated on HLA-DR⁺CD14⁻ cells. (b) Graphical summary of the median percentage (left) and absolute number (cells/ μ L, right) of pDCs, mDC1 and mDC2 found in the blood of CML (n=25) and controls (n=25) (Percentage: *** p <0.0001, * p =0.0119 and ** p =0.0015; Absolute number: *** p <0.0001, *** p =0.0007, ** p =0.0014) Significant differences comparing control to CML were assessed by nonparametric Mann-Whitney test. (c) Graphical correlation between % and absolute number of pDCs, mDC1 and mDC2 found in the blood of CML. Each dot represents an individual patient or control. Correlations were based on Spearman's R coefficient of concordance.

Figure 2. Evaluation of the clinical significance of low DCs prior to allogeneic SCT in CML patients. (a) Kaplan-Meier estimations of CML patient survival post-allogeneic SCT based on the proportion of pDC (top), mDC1 (middle) and mDC2 (bottom) found in peripheral blood prior to SCT (n=22). Left panel shows Kaplan-Meier plot survival based on total DCs. P-values were generated by the Log-rank test. (b) Proportion of CD11c⁺ DC in CML patients who developed aGVHD (* p =0.0287), cGVHD or relapse (open boxes) and those who do not develop these complications (shaded boxes). (c) Proportion of pDC (* p =0.0317), mDC1 (* p =0.0447) and mDC2 (** p =0.0092) in patients who developed acute GVHD (open boxes) or none (shaded boxes). Results are shown as box plots depicting the median (bar), the 10th and 90th percentiles (box) and the range (whiskers), P-value by the Mann-Whitney U test.

Figure 3. Defective production of DCs from patients with CML. (a) The proportion of CD1a⁺ DCs generated from CML CD34⁺ cells (n=10) is significantly lower by day 5, 10 and 15 than healthy controls (n=9) (** p =0.01 and * p =0.05 and * p =0.05 respectively). (b) Absolute number of DC cells generated from CD34⁺ cells obtained from CML patients (n=10) and healthy controls (n=7) at days 5 and 10 of cell culture. Results were normalized to an initial number of 1×10^5 CD34⁺ cells. Each dot represents an individual patient. For all patients evaluated, the absolute number of DC was lower for CML patients than

healthy controls, at day 5 and day 10 ($p=0.001$ and $p=0.005$). (c) The total number of CD1a⁺ cells obtained in CML patients (n=8) demonstrates decreased production of DCs at day 5 (** $p=0.0014$), 10 (** $p=0.0006$), 15 and 20 (** $p=0.004$) over healthy controls (n=7). (d) Mean value of CD1a⁺ DCs generated in control and CML patients (n=2) with delayed outgrowth of DCs after 15 and 20 days of culture. The mean number of CML DCs in these two patients was lower than controls at day 5 and 10. Results represent mean \pm SEM). One CML patient wherein CD34⁺ cells completely failed to produce DCs was removed from the analyses. Data were assessed by nonparametric T tests.

Figure 4. Proliferation of CML DC precursors. (a) Total number of cells generated from CML (n=8) and healthy control CD34⁺ cells (n=5). Results were normalized to an initial number of 1×10^5 CD34⁺ cells. Results represent the mean value. (b) The proliferation of CML CD34⁺ cells was evaluated using CFSE labeling and compared to one normal control. Cells were analyzed after 5 days in culture. Black lines represent the intensity of fluorescence of CFSE staining at time 0. Grey lines represent CFSE dilution after 5 days in culture. (c) Evaluation of the loss of CD34 antigen early during cell culture of healthy and CML CD34⁺ cells. Down-regulation of CD34⁺ receptor and expression of CD1a receptor were evaluated for patient CML 2 (producing few DCs) and a healthy control after 4 days in culture. (d) Production of DCs from adherent CD14⁺ cells evaluated at days 5, 7 and 10 post-culture. Results of 3 controls and 4 CML patients are represented as mean \pm SEM. (e) Effect of DC expansion on the selection of bcr-abl⁺ cells. Bcr-abl positivity was evaluated by FISH before culture in CD34⁺ and CD14⁺ selected cells, and then on CD1a⁺ DCs sorted at days +15 (left: for DC generated from CD34⁺ cells) and +7 (right: for DC generated from CD14⁺ cells). A minimum of 3 different samples were evaluated for each group. Results represent mean \pm SEM.

Figure 5. Evaluation of the clonogenic fraction of CD34⁺ progenitor cells. (a) Mean distribution of CFU-E, BFU-E, CFU-GM and CFU-Mix colonies from 5 controls (white) and 4 CML patients (black). (b) Correlation between the numbers of DCs obtained after 20 days of culture and the number of CFU-Mix (left panel)

and CFU-GM (right panel) colonies. **(c)** CFU-E, BFU-E, CFU-GM and CFU-Mix distribution in 4 CML patients presenting low numbers of DCs at days 5, 10, 15 and 20 of cell culture. **(d)** Individual value obtained for patient CML 9, that presented an abnormally high number of DCs by day 15 and 20 of culture. Error bars correspond to SEM, and each sample was plated twice.

References

1. Burgdorf SK, Fischer A, Claesson MH, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Rosenberg J. Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2006;25(2):201-206.
2. Mohty M, Olive D, Gaugler B. Leukemic dendritic cells: potential for therapy and insights towards immune escape by leukemic blasts. *Leukemia*. 2002;16(11):2197-2204.
3. Hernandez J, Garcia-Pons F, Lone YC, et al. Identification of a human telomerase reverse transcriptase peptide of low affinity for HLA A2.1 that induces cytotoxic T lymphocytes and mediates lysis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12275-12280.
4. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195(10):1279-1288.
5. Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2001;7(7):789-794.
6. Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, et al. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood JID - 7603509*. 2000;95(5):1781-1787.
7. Syme R, Bryan T, Duggan P, Bajwa R, Stewart D, Gluck S. Priming with dendritic cells can generate strong cytotoxic T cell responses to chronic myelogenous leukemia cells in vitro. *Stem Cells Dev*. 2004;13(2):211-221.
8. Sun JY, Senitzer D, Forman SJ, Chatterjee S, Wong KK, Jr. Identification of new MHC-restriction elements for presentation of the p210(BCR-ABL) fusion region to human cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52(12):761-770.
9. Crough T, Nieda M, Morton J, Bashford J, Durrant S, Nicol AJ. Donor-derived b2a2-specific T cells for immunotherapy of patients with chronic myeloid leukemia. *J Immunother*. 2002;25(6):469-475.
10. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood JID - 7603509*. 1999;94(4):1201-1208.
11. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*. 1988;108(6):806-814.

12. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86(5):2041-2050.
13. Pichert G, Roy DC, Gonin R, et al. Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*. 1995;13(7):1704-1713.
14. Mutis T, Schrama E, van Luxemburg-Heijs SA, Falkenburg JH, Melief CJ, Goulmy E. HLA class II restricted T-cell reactivity to a developmentally regulated antigen shared by leukemic cells and CD34+ early progenitor cells. *Blood*. 1997;90(3):1083-1090.
15. Yotnda P, Firat H, Garcia-Pons F, et al. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2290-2296.
16. Kim HJ, Kim TG, Cho HI, Han H, Min WS, Kim CC. The clinical implications of mixed lymphocyte reaction with leukemic cells. *Int J Hematol*. 2002;76(4):370-375.
17. Wagner WM, Ouyang Q, Pawelec G. Peptides spanning the fusion region of Abl/Bcr are immunogenic and sensitize CD8(+) T lymphocytes to recognize native chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2002;16(11):2341-2343.
18. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000;6(9):1018-1023.
19. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-296.
20. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994;180(1):83-93.
21. Yasukawa M, Ohminami H, Kojima K, et al. HLA class II-restricted antigen presentation of endogenous bcr-abl fusion protein by chronic myelogenous leukemia-derived dendritic cells to CD4(+) T lymphocytes. *Blood*. 2001;98(5):1498-1505.
22. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*. 1997;186(5):665-672.
23. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*. 1992;360(6401):258-261.
24. Muller L, Pawelec G. Chronic phase CML patients possess T cells capable of recognising autologous tumour cells. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(5):943-951.

25. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999;94(4):1201-1208.
26. Nieda M, Nicol A, Kikuchi A, et al. Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8+ T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1998;91(3):977-983.
27. Mannering SI, McKenzie JL, Fearnley DB, Hart DN. HLA-DR1-restricted bcr-abl (b3a2)-specific CD4+ T lymphocytes respond to dendritic cells pulsed with b3a2 peptide and antigen-presenting cells exposed to b3a2 containing cell lysates. *Blood*. 1997;90(1):290-297.
28. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*. 1996;88(9):3522-3527.
29. Zorn E, Orsini E, Wu CJ, et al. A CD4+ T cell clone selected from a CML patient after donor lymphocyte infusion recognizes BCR-ABL breakpoint peptides but not tumor cells. *Transplantation*. 2001;71(8):1131-1137.
30. Lindner I, Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, et al. Induced dendritic cell differentiation of chronic myeloid leukemia blasts is associated with down-regulation of BCR-ABL. *J Immunol*. 2003;171(4):1780-1791.
31. Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, et al. Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate. *Leukemia*. 2004;18(10):1656-1661.
32. Grunebach F, Mirakaj V, Muller MR, Brummendorf T, Brossart P. BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. 2006;66(11):5892-5900.
33. Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, et al. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood*. 2003;101(9):3560-3567.
34. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*. 1991;7(5):149-154.
35. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159.
36. Schnyder B, Lugli S, Feng N, et al. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 bind to a shared heterodimeric complex on endothelial cells mediating vascular cell adhesion molecule-1 induction in the absence of the common gamma chain. *Blood*. 1996;87(10):4286-4295.

37. Mohty M, Isnardon D, Vey N, et al. Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors. *Br J Haematol.* 2002;119(1):115-118.
38. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2008;9(11):1253-1260.
39. Bedi A, Griffin CA, Barber JP, et al. Growth factor-mediated terminal differentiation of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1994;54(21):5535-5538.
40. Orsini E, Calabrese E, Maggio R, et al. Circulating myeloid dendritic cell directly isolated from patients with chronic myelogenous leukemia are functional and carry the bcr-abl translocation. *Leuk Res.* 2006;30(7):785-794.
41. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood.* 1996;88(6):2279-2287.
42. Guimond M, Freud AG, Mao HC, et al. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol.* 2010;184(6):2769-2775.
43. Guimond M, Fry TJ, Mackall CL. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother.* 2005;28(4):289-294.
44. Li Y, Geng S, Du X, et al. Restricted TRBV repertoire in CD4+ and CD8+ T-cell subsets from CML patients. *Hematology.* 2011;16(1):43-49.

2.2. Résultats et tableaux

Table 1: Patients and characteristics

<i>Characteristics</i>	<i>Values</i>
Disease, no. of patients chronic myeloid leukemia	25
Allograft	22
No transplantation *	3
Transplant type, no of patients (%)	
Bone marrow 6 of 6 HLA-identical	11 (44%)
Sibling donor, 6 of 6 HLA-identical	10 (91%)
Unrelated donor, 6 of 6 HLA-matched	1 (9%)
Peripheral stem cells 6 of 6 HLA-identical	11 (44%)
Sibling donor, 6 of 6 HLA-identical	8 (72.7%)
Unrelated donor, 6 of 6 HLA-matched	2 (18.2%)
Unrelated donor, 5 of 6 HLA-matched	1 (9.1%)
Age at transplantation, median (range), years	
Allograft Recipients	39 (22-58)
Male/Female allograft recipients	
Male recipients	13 (59%)
Sex-mismatched male recipients, no. (%)	8 (36%)
Disease status at allograft transplantation	
Responsive disease - complete response, no. (%)	18 (81.8%)
First line treatment, no. of allograft recipients (%)	
Hydrea	22 (100%)
Interferon	5 (22.7%)
Conditioning regimen, no. of allograft recipients (%)	
Cy plus Busulfan	22 (100%)
GVHD prophylaxis, no. of allograft recipients (%)	
CsA and MTX	12 (54.5%)
CsA, MTX, Prednisone	9 (41%)
Tracrolimus, Prednisone	1 (4.5%)
Post-Allograft CMV infection	
no. of patients (%)	8 (36.4%)
time to diagnosis, median (range), days post-graft	34.5 (5-72)
Acute GVHD **	
no. of patients (%)	5 (23.8%)
time of occurrence, median (range), days post-graft	44 (39-55)
Chronic GVHD **	
no. of patients (%)	12 (57.1%)
time of occurrence, median (range), days post-graft	240 (111-664)
Relapse of original malignancy **	
no. of patients (%)	3 (14.3%)
time of occurrence, median (range), months post-graft	25 (4-60)
Overall survival	
no. of deceased patients (%)	7 (31.8%)
time of occurrence, median (range), days post-graft	(13-831)

Cy, Cyclophosphamide; CsA, Cyclosporine A; MTX, Methotrexate; CMV, cytomegalovirus.

*bone marrow available, no blood samples

** missing data for 1 patient

Figure 1

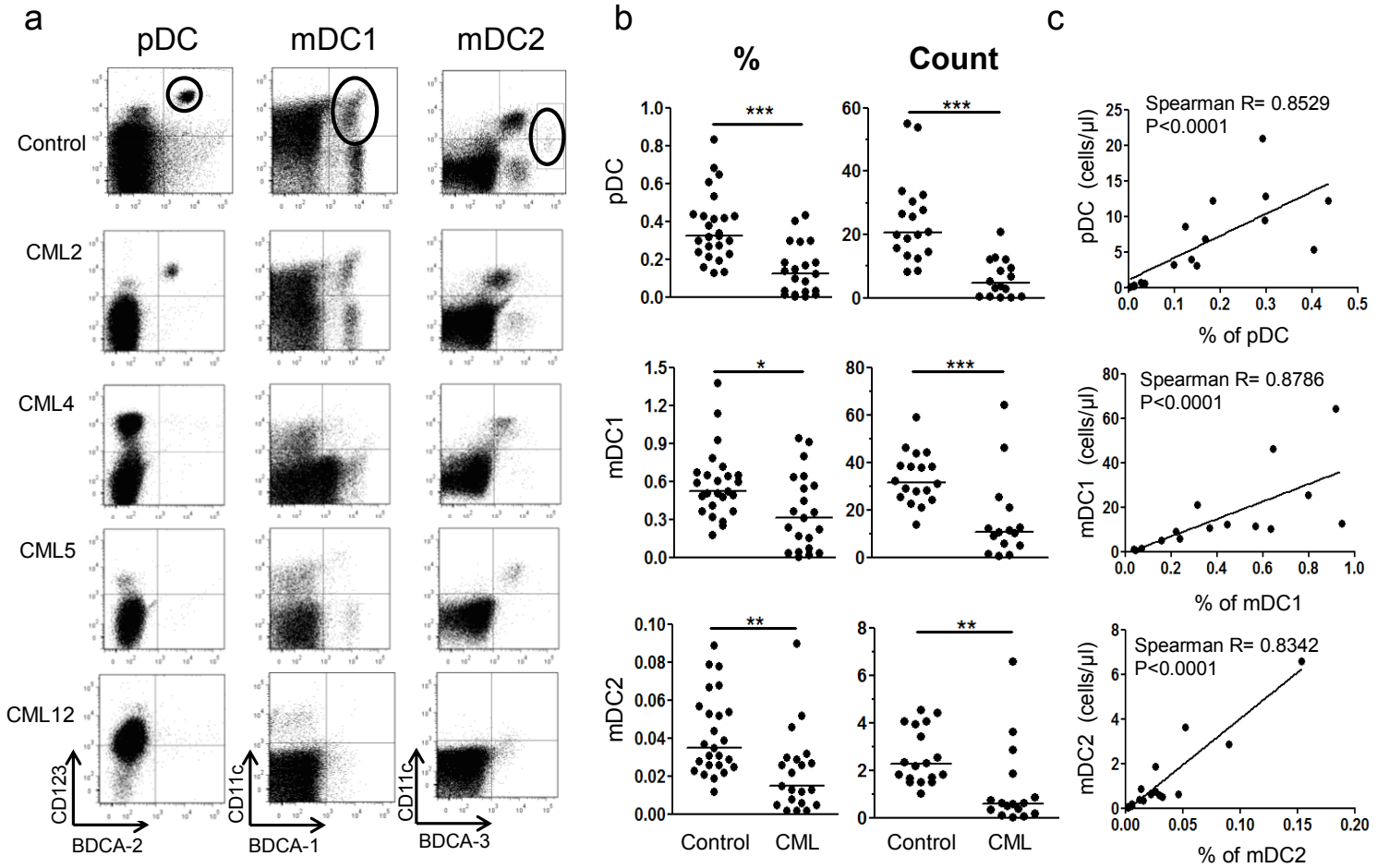


Figure 2

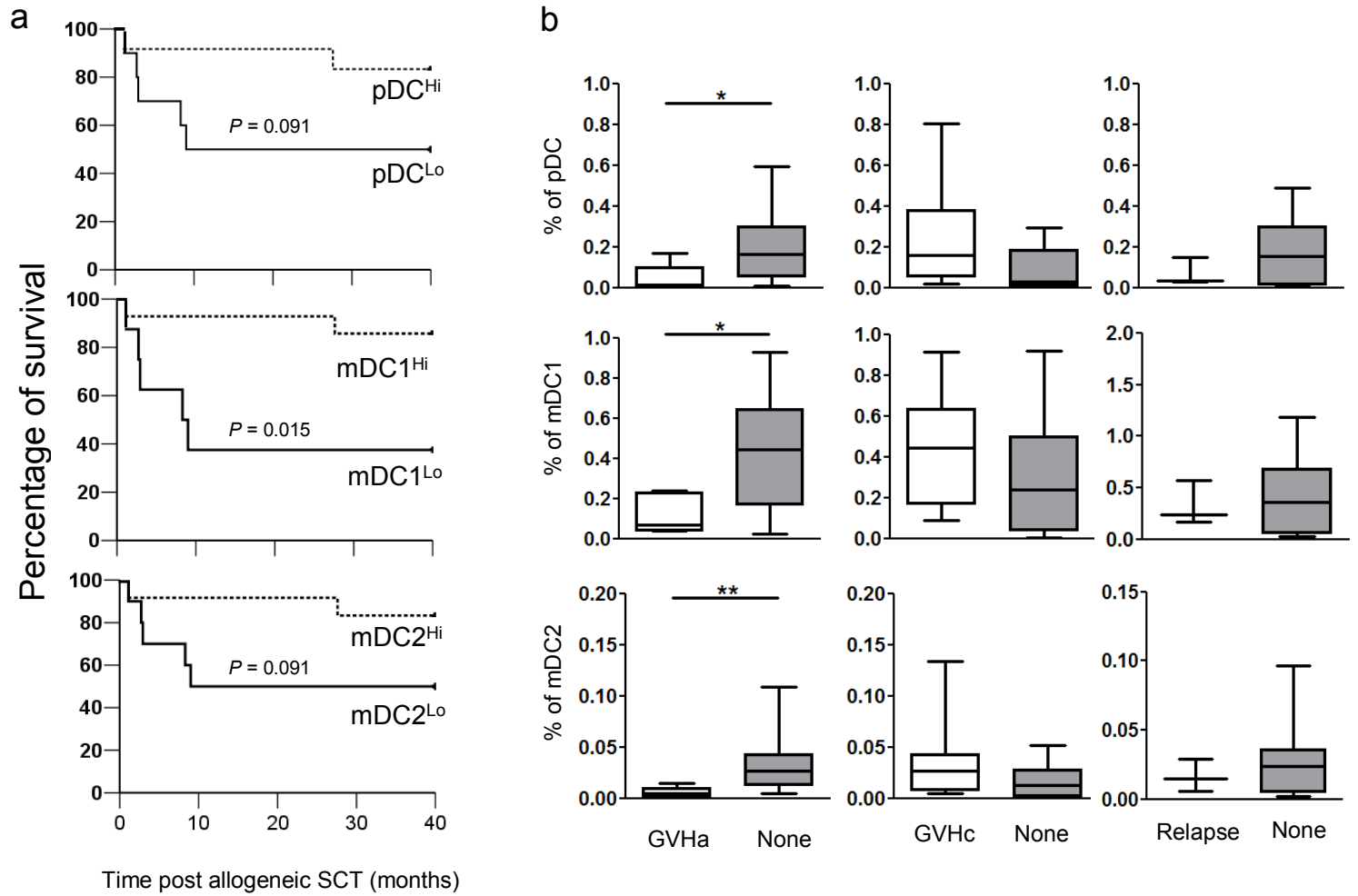


Figure 3

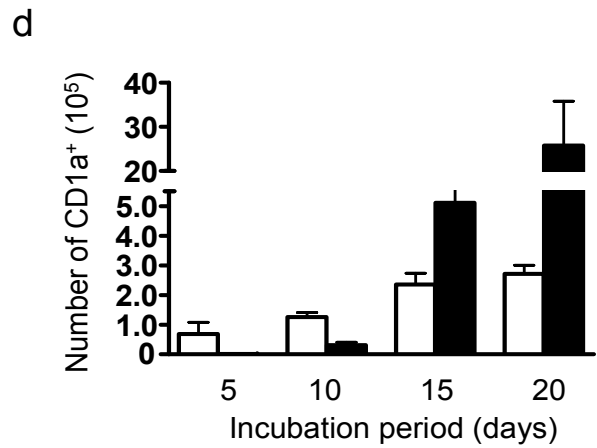
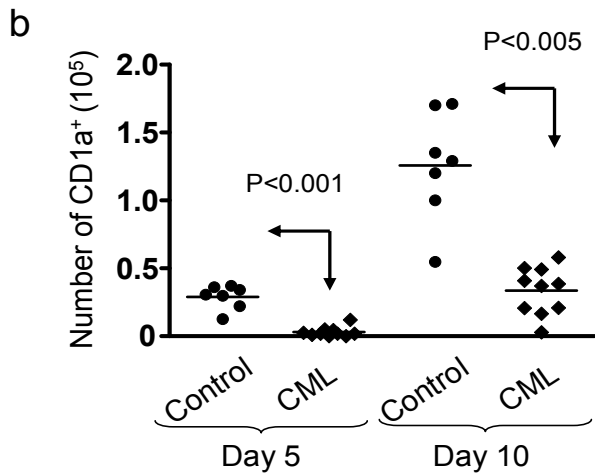
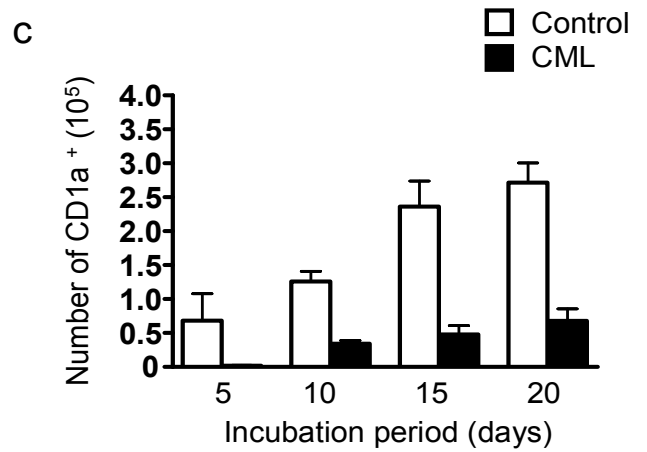
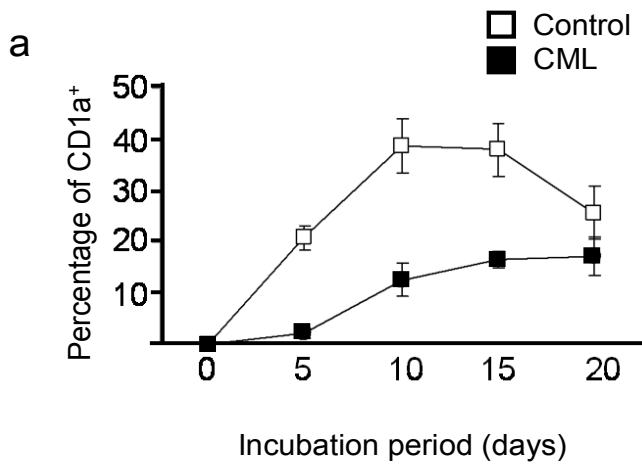


Figure 4

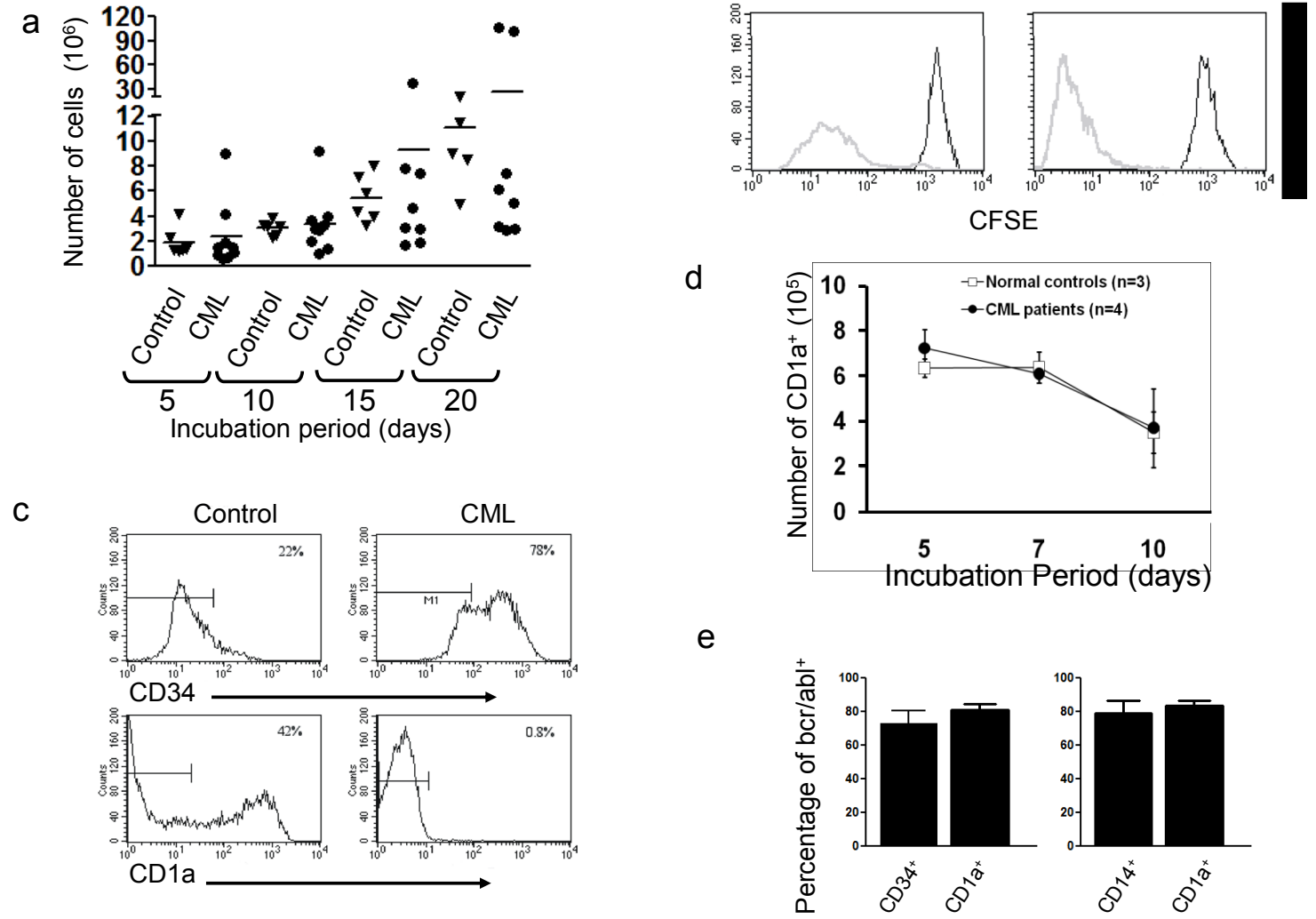
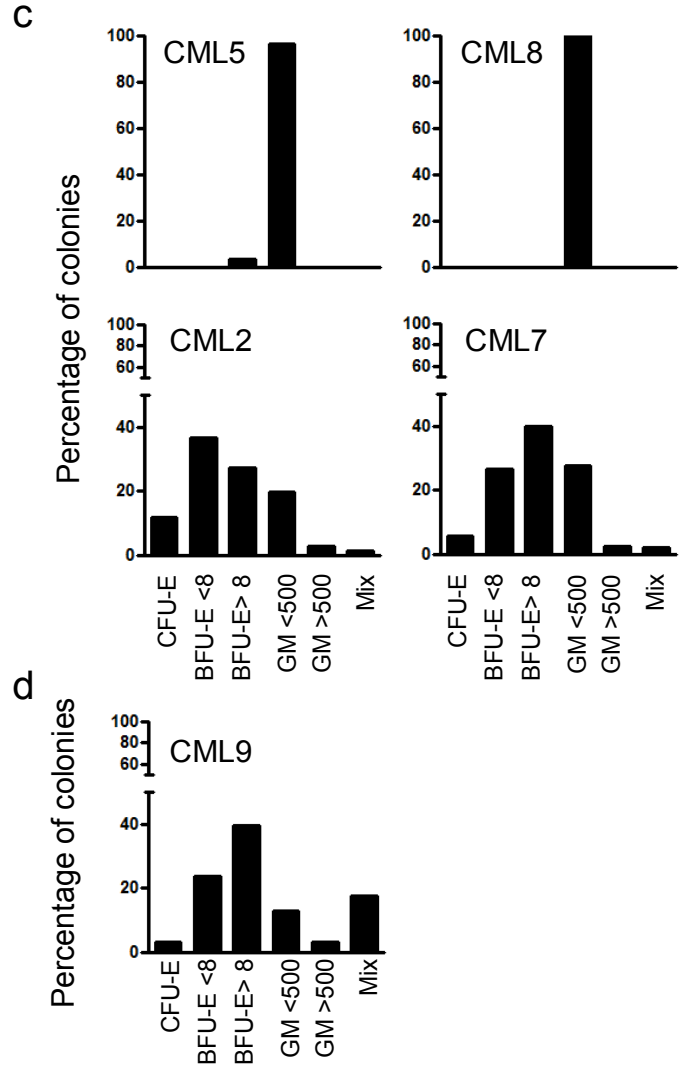
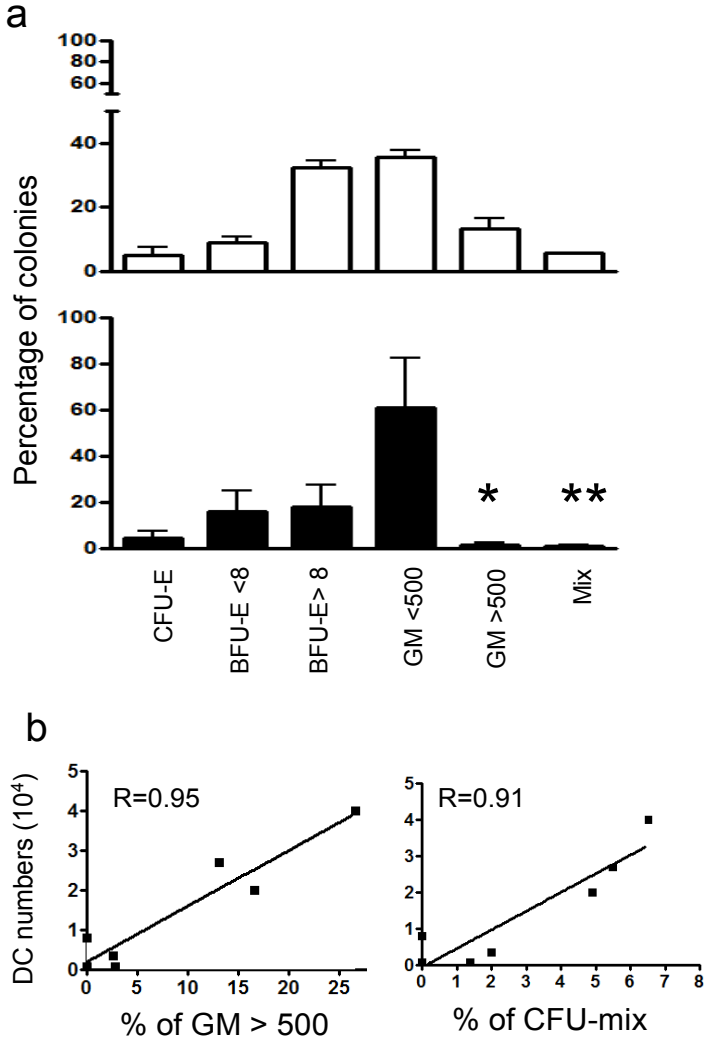
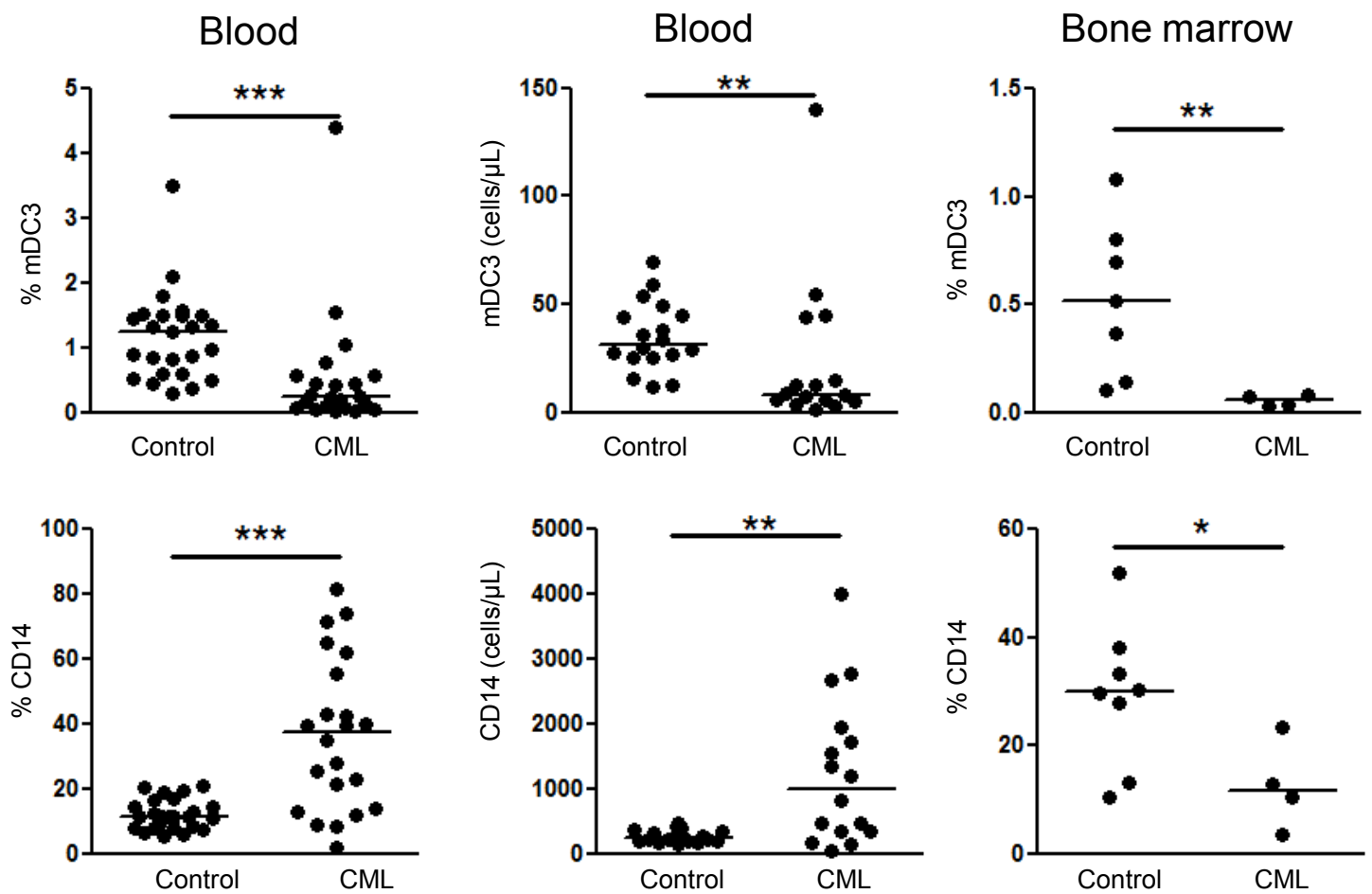


Figure 5



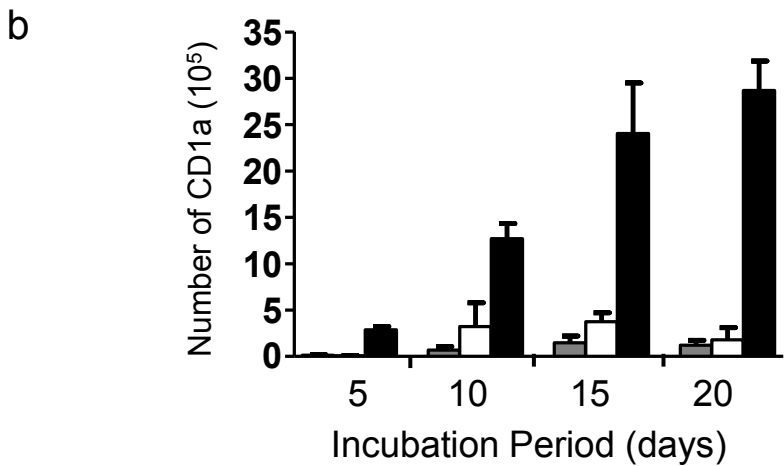
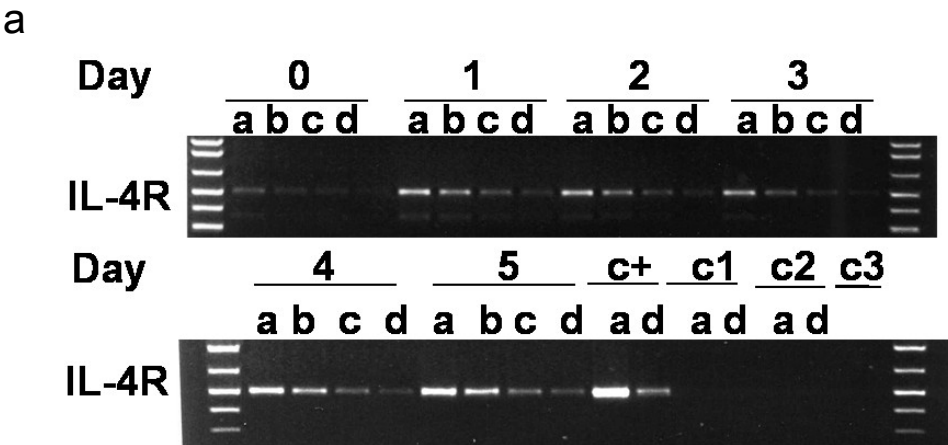
3.3. Figures supplémentaires

Supplemental Figure 1



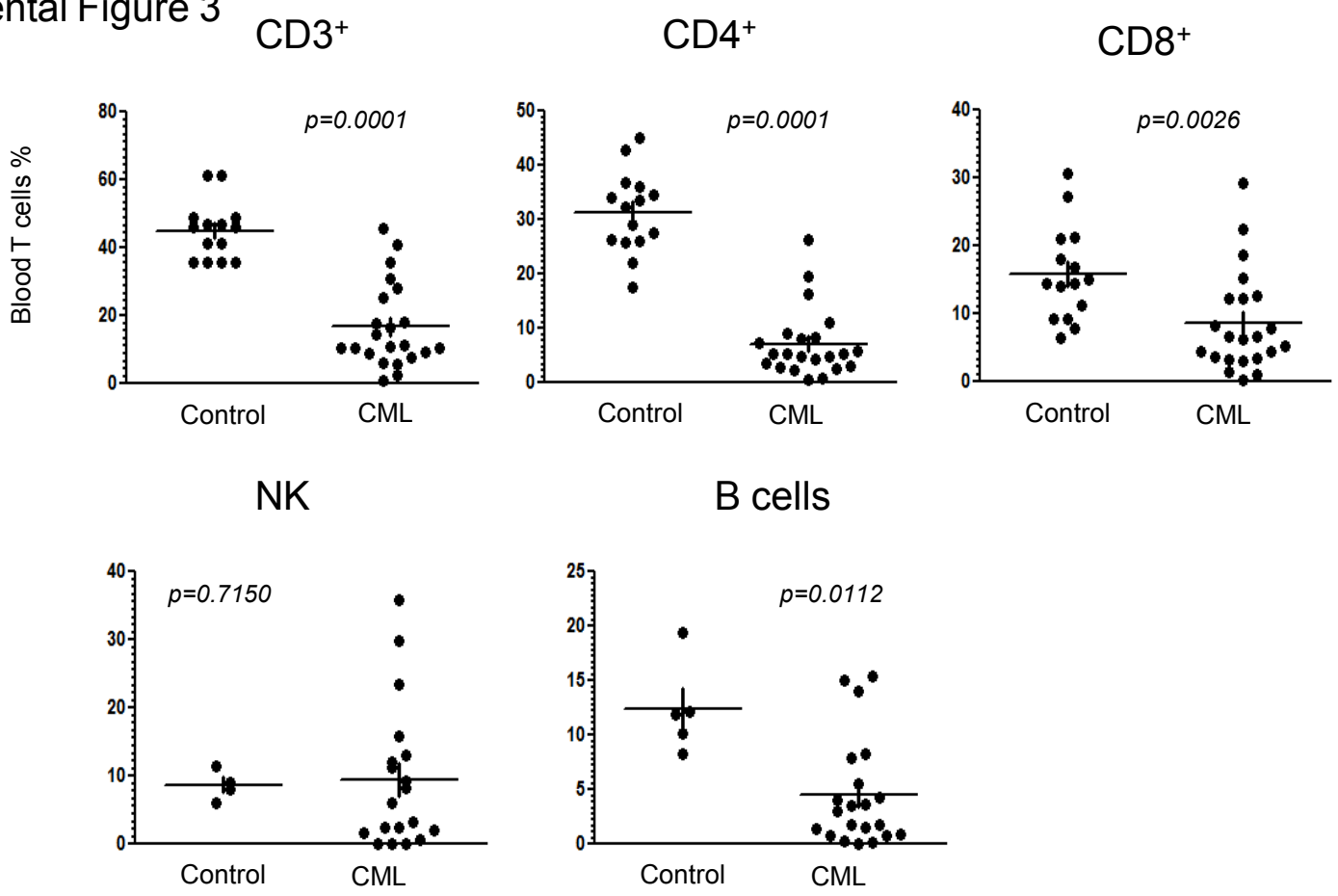
Supplemental Figure 1. Evaluation of mDC3 and monocytes in the blood of CML patients. Graphical summary of the median percentage (a) and absolute number of mDC3 and monocytes found in the blood and bone marrow of CML and normal controls. Each dot represents an individual patient or control.

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 3. Analysis of IL-4 receptor expression. (A and B) IL-4 receptor expression at baseline (Day 0) and after 1 to 4 days in culture. Initial amounts of cDNA were (a) 100, (b) 50, (c) 25 and (d) 12.5 µg and positive controls (c+) consisted of PHA-activated blast cells. K562 (c1), M2-10B4 (c2) and water (c3) were negative controls.(A) IL-4 concentration and DC generation from CD34⁺ cells. CML CD34⁺ cells were cultured with 10 U/ml (white) or 1000 U/ml (grey) IL-4. Controls consisted of healthy CD34⁺ cells cultured with 10 U/ml of IL-4 (black). Results represent mean±SD of 2 CML and 2 healthy controls.(B)

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 2. Evaluation of T and B lymphocytes and NK cells proportions in CML blood samples. Graphical summary of the mean value of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ lymphocytes(a), natural killer cells and B lymphocytes found in the blood of CML and controls. Each dot represents an individual patient or control.

4. Discussion

4.2. Discussion

4.2.1. Leucémie myéloïde chronique: Biomarqueurs de progression et traitement

La LMC est causée par une translocation affectant les cellules souches pluripotentes du système hématopoïétique. Au cours de la phase chronique, les cellules souches leucémiques conservent leurs capacités de se différencier en cellules matures²¹⁷. Lors de l'évolution de la maladie vers la forme blastique, les cellules souches leucémiques perdent cette capacité²¹⁸. Les patients LMC qui progressent vers une phase blastique ont une espérance de vie réduite comparativement à ceux en phase chronique. C'est habituellement l'énumération des cellules blastiques qui sert à identifier la phase de la maladie (Tableau 3). Curieusement, plusieurs patients LMC inclus dans notre étude possèdent un nombre très réduit de DC. Puisque ces cellules ont une différenciation terminale complexe, il serait intéressant de déterminer si la baisse du nombre de cellules dendritiques au niveau du sang coïncide avec une évolution de la maladie vers une phase blastique. Dans ce contexte, les DC pourraient servir de biomarqueur afin de suivre et de prédire l'évolution de la maladie. En effet, la perte de DC est associée à des changements majeurs au niveau de la distribution des cellules progénitrices CD34⁺ de la moelle osseuse. Cette accumulation de cellules progénitrices commises a possiblement un impact plus important sur les cellules dendritiques que sur d'autres cellules immunitaires puisque la demi-vie de ces cellules est reconnue comme étant courte²¹⁹. Pour connaître l'impact clinique de la perte des DC sur l'évolution de la maladie, nous aurions besoin d'effectuer une étude clinique longitudinale afin de déterminer si la perte des DC est une étape qui précède la transformation blastique.

Tableau 3: Critères diagnostiques chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique ou accélérée. Inspiré de *Cancer principles and practice of oncology 9th (2011)*

Registre international de la transplantation de moelle osseuse*
Compte difficile à contrôler avec bisulfan et hydroxy urée
Doublage du compte cellulaire rapide (moins de 5 jours)
Présence de blastes aux niveau du sang ou de la moelle osseuse entre 10% et 30%
Présence de blaste et de promyélocytes dans le Sang périphérique ou de la moelle osseuse supérieur ou égale à 20%
Plus de 20% de basophile et éosinophile en périphérie
Splénomégalie ou leucocytoses sans réponse au traitement
Anémie ou thrombocytopenie ($<100 \times 10^9/L$) sans réponse à bisulfan et hydroxy urée
Thrombocytose persistante
Évidences cytogénétiques évolution clonale
Large foyer ou groupe de blaste dans la biopsie de la moelle osseuse
Prolifération de blaste extramédullaire
Splénomégalie et myélofibrose progressive

* Pour plus de détails voir classification des cancers hématologiques de l'Organisation mondiale de la santé (Tableau supplémentaire 8 et 9)

4.2.2. Pharmacothérapie des LMC

L'imatinib (Gleevec) représente un des plus importants succès académique et de l'industrie pharmaceutique du 20^{ème} siècle. Le Gleevec est un inhibiteur non compétitif de tyrosine kinase (TKI) qui permet d'inhiber la phosphorylation incontrôlée de substrats^{220,221}. Depuis quelques années, d'autres composés de deuxième génération tels que le nilotinib (Novartis) et le dasatinib (BMS) ont aussi été mis en marché²²². Pour les patients qui ne répondent pas à la dose standard d'imatinib, une augmentation progressive de la dose ou l'utilisation de la deuxième génération de TKI représente une autre option pour le traitement de la LMC. Bien que le Gleevec soit le nouveau candidat idéal dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, plusieurs facteurs viennent interférer avec son efficacité ou annulent complètement son effet^{223,224}. Ces facteurs incluent l'amplification du gène BCR-ABL par les cellules leucémiques²²⁵, la mutation de BCR-ABL dans les domaines de fixation par le Gleevec(T315I), l'effluve de Gleevec par des canaux protéiques tels que Pgp et MDR, la fixation par AGP²²⁶ et l'activation constitutive de la signalisation en aval de BCR-ABL²²⁷. Pour les patients qui développent ces résistances, la greffe de SCH allogénique reste une importante voie thérapeutique. Par contre, comme il est expliqué plus loin dans ce texte, il est possible que le traitement au TKI interfère avec l'efficacité de l'effet GVL.

4.2.3. Les leucémie myéloïde chronique, un modèle idéal pour l'effet GVL

L'effet GVL suite à une greffe de moelle osseuse allogénique a été décrit abondamment pour la LMC²²⁸. Les CPA ainsi que l'expression d'antigènes tumoraux pourraient expliquer l'effet GVL dans un contexte de greffe de moelle osseuse pour traiter les LMC. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi l'allogreffe est moins efficace pour traiter les sujets LMA qui n'ont pas de cellules dendritiques leucémiques. Les CPA du receveur ont un rôle critique dans la GVL bien que les CPA du donneur, à la suite de la régénération suite à la greffe, pourraient contribuer au maintien de la réponse anti tumorale²²⁹. De plus, les lymphocytes T dit "antigen-experienced" auraient des besoins moins élevés pour leurs activations.

Une présentation croisée effectuée par les APC du donneur pourrait donc être suffisante malgré la quantité faible de peptides de l'hôte présentés aux lymphocytes T du donneur^{230,231,232,233}. Malheureusement, l'absence de reconstitution des DC du donneur laisserait présager un faible bénéfice de ceux-ci sur l'effet GVL²³⁴. (Figure supplémentaire 6). Les CPA de l'hôte seraient efficaces pour déclencher l'effet GVL puisque celles-ci s'activeraient immédiatement suite à la chimiothérapie. Lors de leur migration au niveau des ganglions lymphatiques, elles activeraient des lymphocytes du donneur via la présentation de peptides mineurs et/ou peptides tumoraux.

Il est bien connu que les DC leucémiques BCR-ABL⁺ peuvent activer des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à la tumeur²³⁵. Pour cette raison, les infusions de lymphocytes T du donneur (DLI) sont couramment utilisées en clinique afin de remettre en rémission complète les patients LMC qui rechutent. La présentation de peptides qui proviennent de la protéine de fusion BCR-ABL par des APC contribue possiblement à augmenter l'efficacité de la réponse

antitumorale lors d'une DLI. Le peptide p210 généré à partir de la protéine de fusion BCR/ABL servirait de néo-antigènes reconnus par les lymphocytes T cytolytiques de hautes affinités et permet donc une excellente reconnaissance des cellules tumorales^{236,237}. Chez le patient, les néo-antigènes provenant de la protéine BCR/ABL ne seraient par contre pas l'agent immunogène principal de la GVL puisque les lymphocytes T qui le reconnaissent sont rarement cytotoxiques pour les cellules de LMC²³⁸⁻²³⁹.

De plus, il semble que d'autres gènes tels que PRAME, HAGE et PR3 seraient reconnus pour être immunogènes dans les cas de LMC^{240,241,242}. La présentation antigénique étant la spécialité des DC, il est facilement concevable que leur absence chez le patient puisse mener à une augmentation des rechutes leucémiques. Notre étude soulève l'idée que l'effet GVL est d'une efficacité moindre dans plusieurs autres maladies hématologiques malignes, incluant les leucémies myéloïdes aiguës (AML), les leucémies lymphoblastiques aiguës (ALL) ainsi que les leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique dû à l'absence de cellules dendritiques^{243,244,245}. Considérant ces éléments, il fait donc sens que les LMC soient les seuls cancers hématologiques pour lesquels un effet clair de la GVL a été démontré en clinique^{246,247}. Cela fait de cette maladie le candidat idéal pour l'étude de l'effet GVL.

Dans ce contexte de greffe, une diminution du nombre de pDC pourraient aussi expliquer une diminution d'IFN de type I et avoir un impact possible sur la maturation fonctionnelle et la cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes T CD8 dans l'immunité antivirale et l'effet GVL^{248,249}. Chez les patients plus âgés, population particulièrement affecté par les LMC, la production d'interféron de type I par les pDC est généralement diminuée ce qui pourrait

prédisposer aux infections virales²⁵⁰⁻²⁵¹. Les DC myéloïdes ont un rôle important à jouer dans les réactions immunitaires. Ce type de CPA a aussi la capacité de produire de l'IFN de type I en réponse à des infections, mais à des niveaux moindres que les pDC. Contrairement aux pDC qui produisent des niveaux élevés d'IFN de type I sur une période relativement courte, les mDC continuent d'en produire sur une période généralement plus longue après l'infection. Les mDC auraient un rôle plus important dans la défense anti-infectieuse et antitumorale et leur absence pourrait entraîner une augmentation importante des infections et des rechutes chez les patients²⁵². Curieusement, nous n'observons pas d'augmentation du nombre de rechutes parmi les patients qui possèdent peu de mDC1 et/ou de pDC, possiblement parce que le nombre de patients inclus dans notre étude demeure limité. Il est aussi fort probable que d'autres facteurs soient impliqués dans la rechute leucémique.

4.2.4. L'effet des TKI sur la GVL

Comme soulever plus tôt, dans les cas de CML résistantes au TKI, il y a une question importante à se poser: est-ce que la thérapie au TKI diminue les chances de survie suite à une greffe de moelle osseuse allogénique? Des études ont d'ailleurs démontré que la diminution de l'expression de BCR-ABL menait à une diminution importante de la capacité des DC leucémiques à activer les CD8⁺ cytotoxiques, confirmant donc la possibilité que les TKI diminuent l'effet GVL. Certains modèles montrent que l'inhibition de BCR/ABL altère considérablement la maturation des DC ainsi que leurs fonctions²⁵³. De plus, les TKI tel que l'Imatinib et le nilotinib ont démontrés avoir des effets inhibiteurs sur la fonctionnalité et l'immunocompétence des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et sur la production d'immunoglobuline^{254,255,256,257}. Par contre, il a

été démontré *in vitro* que le traitement de DC dérivés de moelle osseuse de souris traitées à des doses pharmacologiques d'imatinib permet le bris de la tolérance des cellules T réactifs aux tumeurs²⁵⁸.

Chez les patients, d'autres tyrosine kinase telles que FLT3, Lck et MAPK sont aussi affectés par des concentrations thérapeutiques de Gleevec²⁵⁹. Ces kinases ne sont pas négligeables car, elles sont très importantes au niveau du système immunitaire, principalement chez les macrophages, les cellules T et les DC²⁶⁰. Ceci nous permet donc de croire que le traitement aux TKI pourrait avoir un impact important sur les cellules non leucémiques. Il fut démontré que ce traitement affectait la maturation des cellules CD34⁺ en cellules dendritiques myéloïdes par la diminution de l'expression de CD1a, CD40, CD80 et CD83. De plus, le traitement diminue significativement la signalisation par FLT3 dans les cellules saines^{261,262}. Le traitement à l'imatinib a par contre démontré une augmentation de la quantité de pDC chez les patients atteints d'une LMC. Paradoxalement, cet effet était causé par une augmentation de la signalisation par FLT3 dans les précurseurs leucémiques BCR/ABL²⁶³.

4.2.5. La rechute qui n'explique pas tout

Bien que les patients ayant fait une rechute tôt suite à la greffe aient en générale des niveaux relativement bas de DC, la rechute en elle-même ne corrèle pas directement avec l'absence de DC au niveau de la circulation périphérique. En effet, plusieurs patients dépourvus de DC sont morts d'autres complications suite à la greffe alors que certains sont encore en vie sans signe apparent de rechute. Comme la rechute leucémique semble reliée directement à l'effet GVL, il est possible

que d'autres facteurs, en plus du compte de DC, puissent prédisposer l'individu à une rechute de sa maladie. Il a d'ailleurs été démontré que les monocytes seraient associés à un meilleur pronostic²⁶⁴. Malheureusement, nous observons une variation importante dans le nombre de monocytes (Figure supplémentaire 1).

De plus, nous n'avons pas analysé la présence de CL au niveau des différents épithéliums des patients LMC. Or, les CL auraient une demi-vie relativement longue et pourraient représenter un réservoir alternatif d'antigènes tumoraux pour favoriser la réaction GVL et diminuer la rechute²⁶⁵. Suite à la chimiothérapie avec ou sans radiothérapie, les CL s'activent et migrent au niveau des ganglions lymphatiques afin de présenter des antigènes aux lymphocytes T²⁶⁶. Puisque la GVH de faible intensité est souvent associée avec une augmentation de l'effet GVL, nous pouvons nous questionner sur le rôle des cellules de Langerhans de l'hôte afin d'initier la réaction GVL. Étonnamment, plusieurs mois après une greffe allogénique, la littérature rapporte un chimérisme mixte pour les cellules de Langerhans est observable²⁶⁷. Plusieurs études sur la GVH ont démontré que les cellules de Langerhans (CL) de l'hôte persistaient pendant plusieurs mois postgreffe et seraient responsables de l'induction de la GVH^{268,269}. Le chimérisme et la reconstitution des LC seraient donc une voie importante à explorer pour expliquer la différence importante entre les patients qui présentent une perte presque totale de DC circulants et qui décèdent d'une rechute par rapport à ceux qui ont une rémission complète.

4.2.6. La GVH chez les patients subissant une allogreffe

Une association entre des niveaux diminués de DC et l'incidence de la GVH a été mise en évidence dans ces travaux. Effectivement, les modèles précliniques ont démontré que la déplétion des pDC pouvait augmenter l'inflammation et les maladies auto-immunes en général. Les pDC ayant la capacité de promouvoir et de supporter la fonction des cellules T régulatrices ainsi que l'expression de IDO^{270,271,272}, supportant donc que l'absence de ce sous-type de DC ait un rôle important dans le déclenchement de la GVH. Des résultats sur la reconstitution précoce des pDC, suite à une greffe allogénique, sembleraient d'ailleurs associés à une diminution de la GVHc chez ces patients (Figure supplémentaire 4).

Une cohorte de patients atteints de GVHc réfractaire au traitement conventionnel semblerait aussi avoir une diminution importante de DC, principalement les pDC (Figure supplémentaire 5). Bien que la perte des DC pourrait elle-même être causée par la GVHc ou la GVHa, l'importance primordiale des DC dans l'homéostasie des Treg et dans la tolérance immunitaire pourrait causer une entrave majeure à la prévention et à la guérison de la GVH.

D'un point de vue postgreffe, la présence de DC semblerait aussi clairement diminuer chez les patients subissant une allogreffe (Figure supplémentaire 6). Cette diminution de DC chez les patients subissant une allogreffe ainsi que chez les patients en GVHc réfractaire corrèle aussi avec une diminution ou un maintien des comptes faibles de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Figure supplémentaire 7 et 8).

4.3. Conclusion

Dans les dernières années, plusieurs options thérapeutiques sont apparues pour les patients atteints d'une LMC et qui permettent un contrôle à long terme de la maladie. Malgré l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase tel que le Gleevec, ce type de traitement ne permet pas d'éliminer les CML résistantes et n'a presque aucun effet sur les cellules souches leucémiques. Ils ne permettent donc pas d'éliminer la maladie et maintiennent un groupe de cellules leucémiques pouvant progresser vers une phase blastique. Pour ce qui est de la greffe allogénique, elle permet d'éradiquer le cancer, mais les complications associées, telle que la morbidité associée à la GVH, nous démontrent que nous sommes encore loin d'un traitement idéal. Plusieurs options pharmacothérapeutiques peuvent être envisagées : la synthèse de molécule chimique pouvant se lier à la mutation principale de BCR-ABL qui confère sa résistance à l'imatinib (T3151) ou a des éléments faisant parties de la cascade de signalisation de BCR-ABL. Mais, des applications immunothérapeutiques sont aussi possibles. Nos résultats sembleraient démontrer que l'immunothérapie est une voie par excellence dans le traitement des LMC.

5. Figures supplémentaires

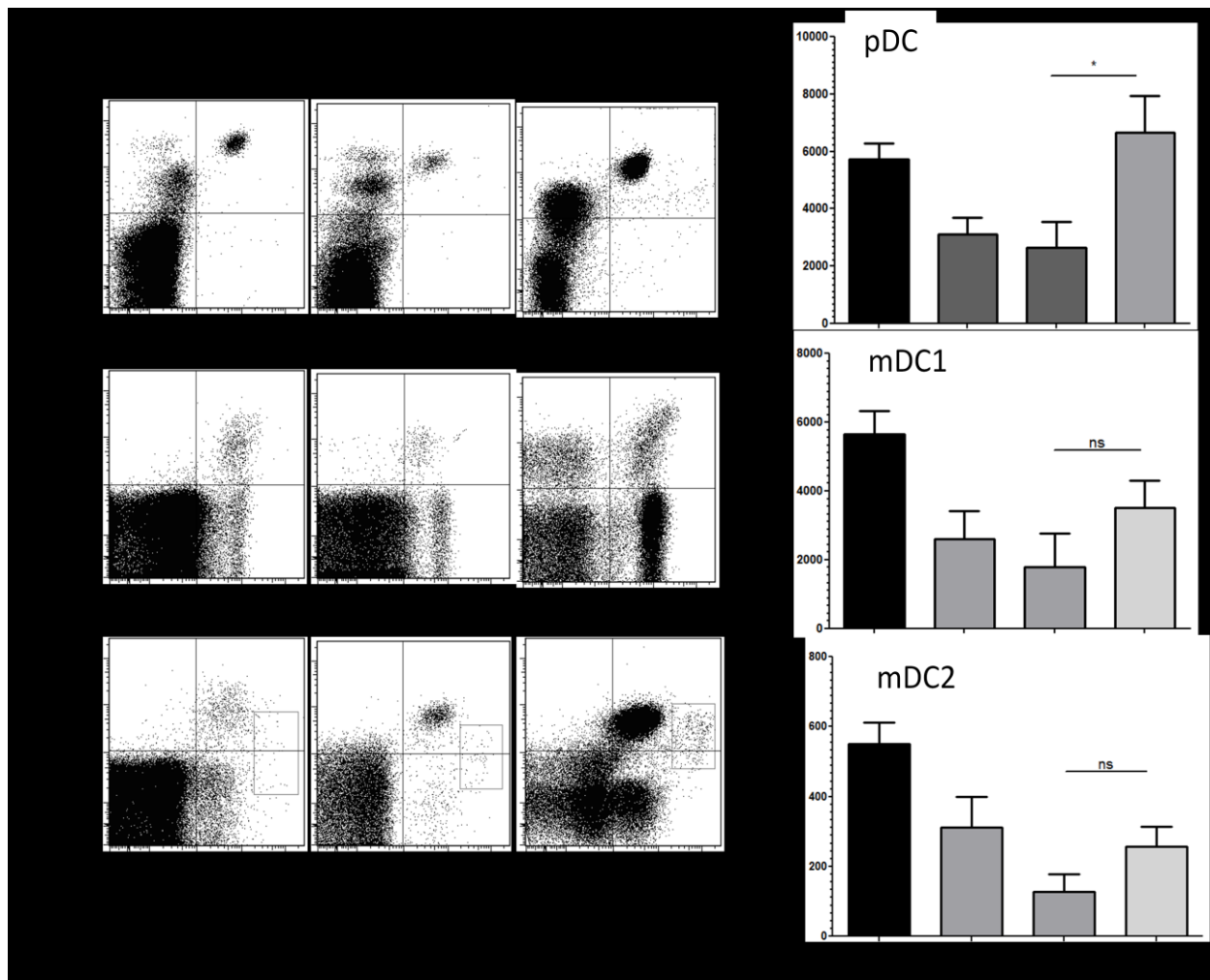


Figure supplémentaire 4. Nombre et pourcentage de DC chez les receveurs 30 jours post-greffe. A) Analyse en cytométrie en flux des pourcentages de cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) et myéloïdes (mDC1 et mDC2) provenant du sang périphérique des patients allogreffé développant une GVHc ou une GVHa et des patients subissant une autogreffe. B) Analyse du nombre DC par ml sur dans le sang périphérique des sujets contrôles (noir n=29), des patients 30 jours post-greffe autologue (Gris n=10), des patients 30 jours post-greffe allogénique ayant développé une GVHa (gris n=6) et cGVHD(blanc n=7). Les valeurs moyennes \pm SEM sont présentées. La différence statistique entre les groupes a été évaluée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. (* $p < 0,05$, ** $p = 0,01$ et *** $p = 0,001$)

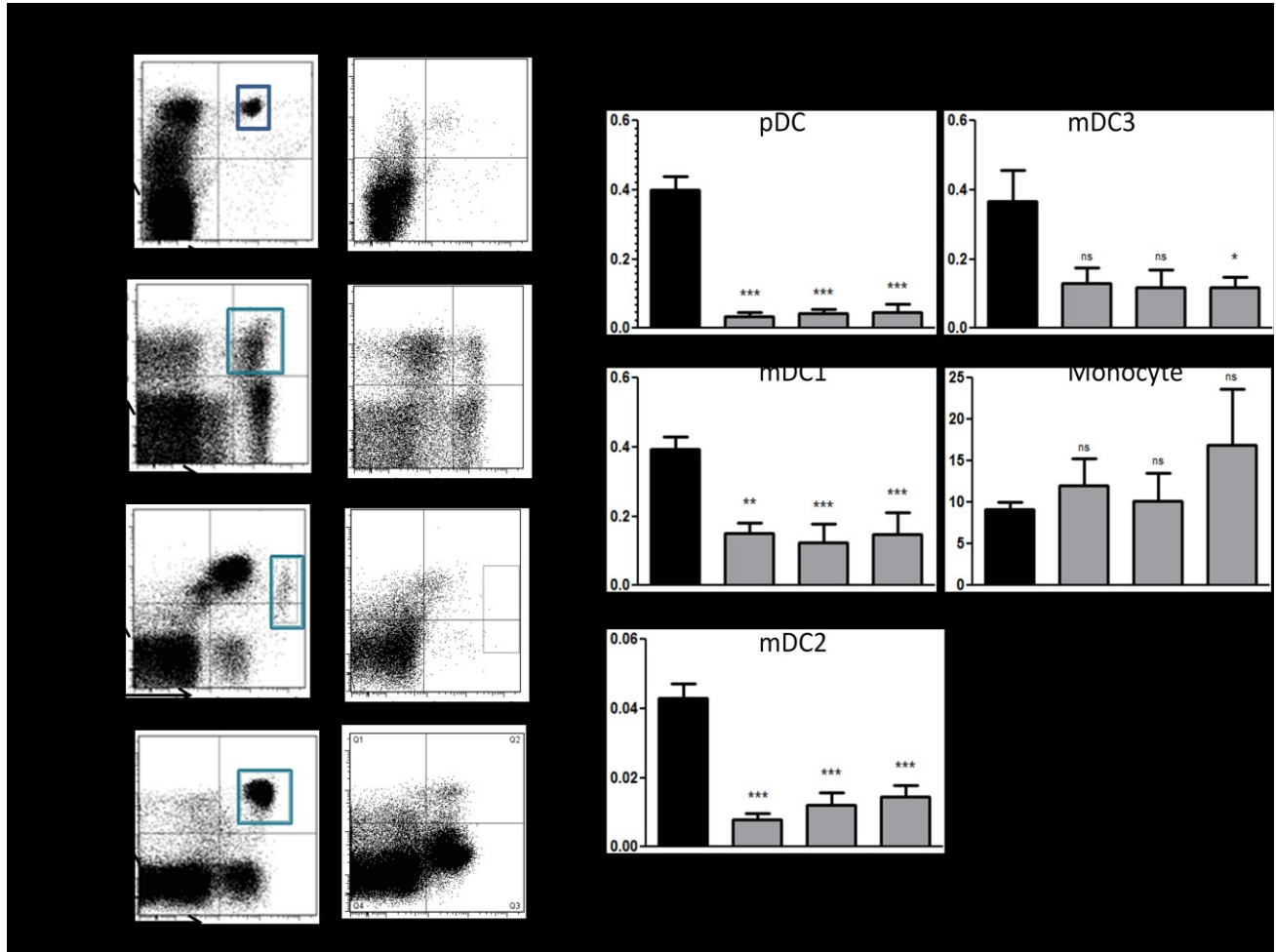


Figure supplémentaire 5. Proportion de DC à 0, 2 et 4 mois chez les patients allogreffés ayant développés une GVHc réfractaire au traitement. A) Analyse en cytométrie en flux des pourcentages de cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) et myéloïdes (mDC1 et mDC2) provenant du sang périphérique des patients en GVH réfractaire. B) Analyse en cytométrie en flux des proportions de DC dans le sang périphérique des sujets sains contrôles (noir, n=29) et des receveurs d'allogreffe développant une GVH réfractaire au traitement (gris n=15). Les pourcentages moyens \pm SEM sont représentés. La différence statistique entre les groupes a été évaluée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. (* $p < 0,05$, ** $p = 0,01$ et *** $p = 0,001$)

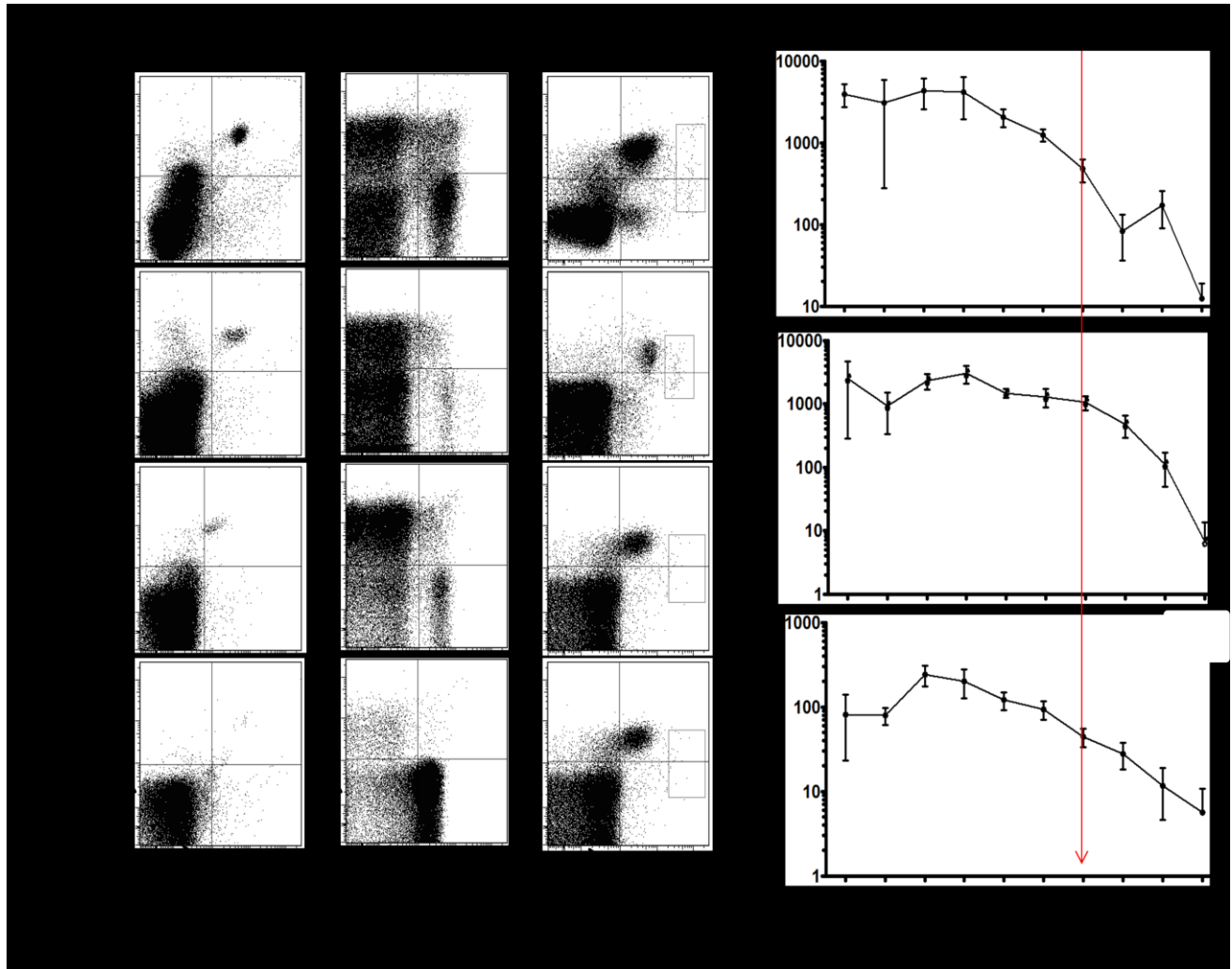


Figure supplémentaire 6. Variation du nombre de DC avant l'apparition de la GVH. À A) Analyse en cytométrie en flux des pourcentages de cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) et myéloïdes (mDC1 et mDC2) provenant du sang périphérique des patients allogreffé (n= 11) développant une GVH.B) Analyse en cytométrie en flux du nombre de pDCs, mDC1 et mDC2 sur le nombre totale de cellules dans le sang périphérique des patients développant une GVH (ligne noire, n=11). Les valeurs moyennes des patients \pm SEM sont présentées mensuellement 4 mois avant le diagnostic de GVH (noté y) jusque 2 mois après le diagnostic.

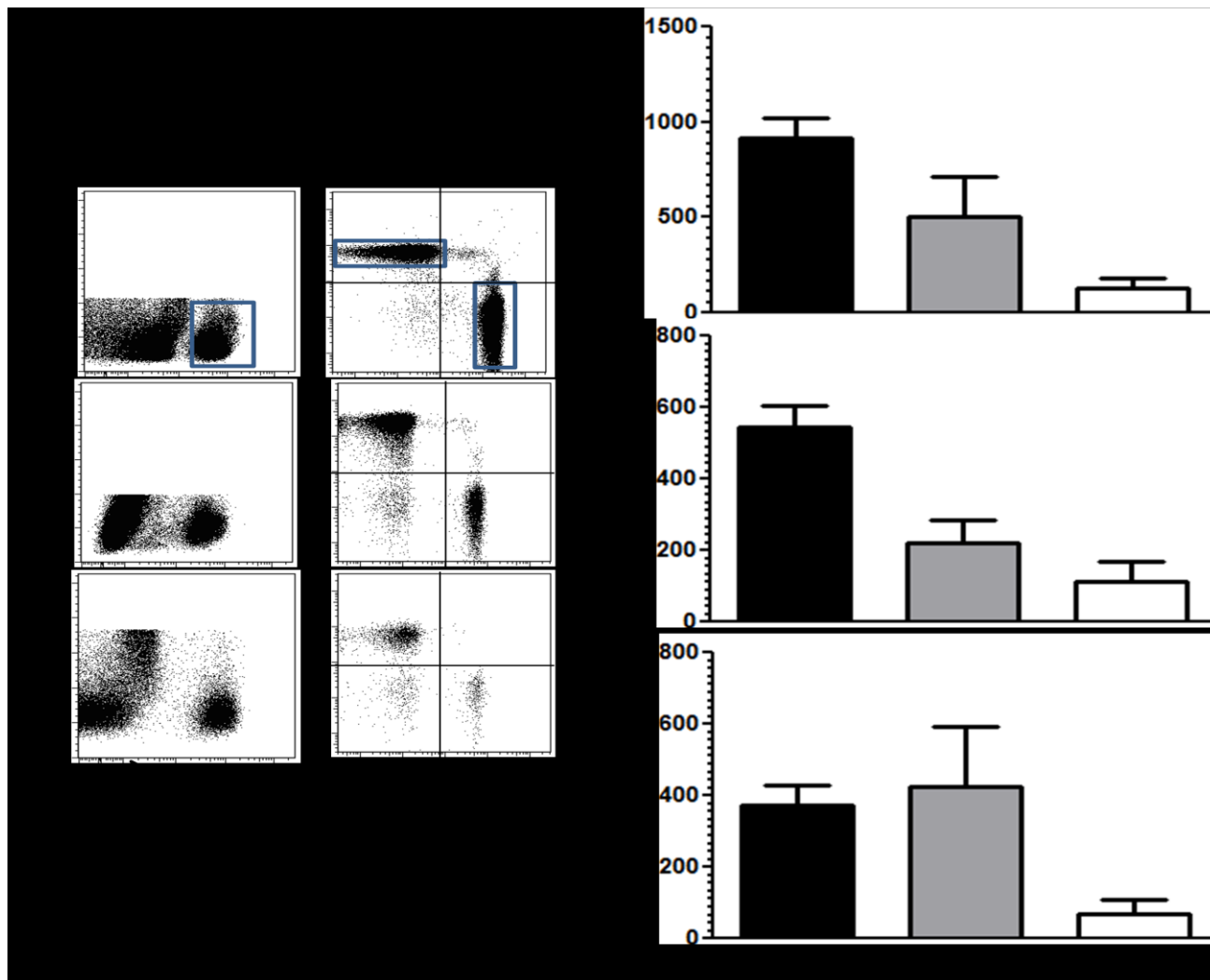


Figure supplémentaire 7. Proportions de Lymphocytes T chez des patients développant une GVHD A) Analyse en cytométrie en flux des pourcentages des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ provenant du sang périphérique des patients autogreffé et allogreffé. B) Analyse en cytométrie en flux des proportions de cellules T CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang périphérique des sujets sains (noir n=29), des patients ayant reçu une autogreffe de CSH (Gris n=10) et des patients ayant développés une GVH après une allogreffe (gris n=11). Les valeurs moyennes ± SEM sont présentées. La différence statistique entre les groupes a été évaluée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. (*p<0,05, **p=0,01 et ***p=0,001)

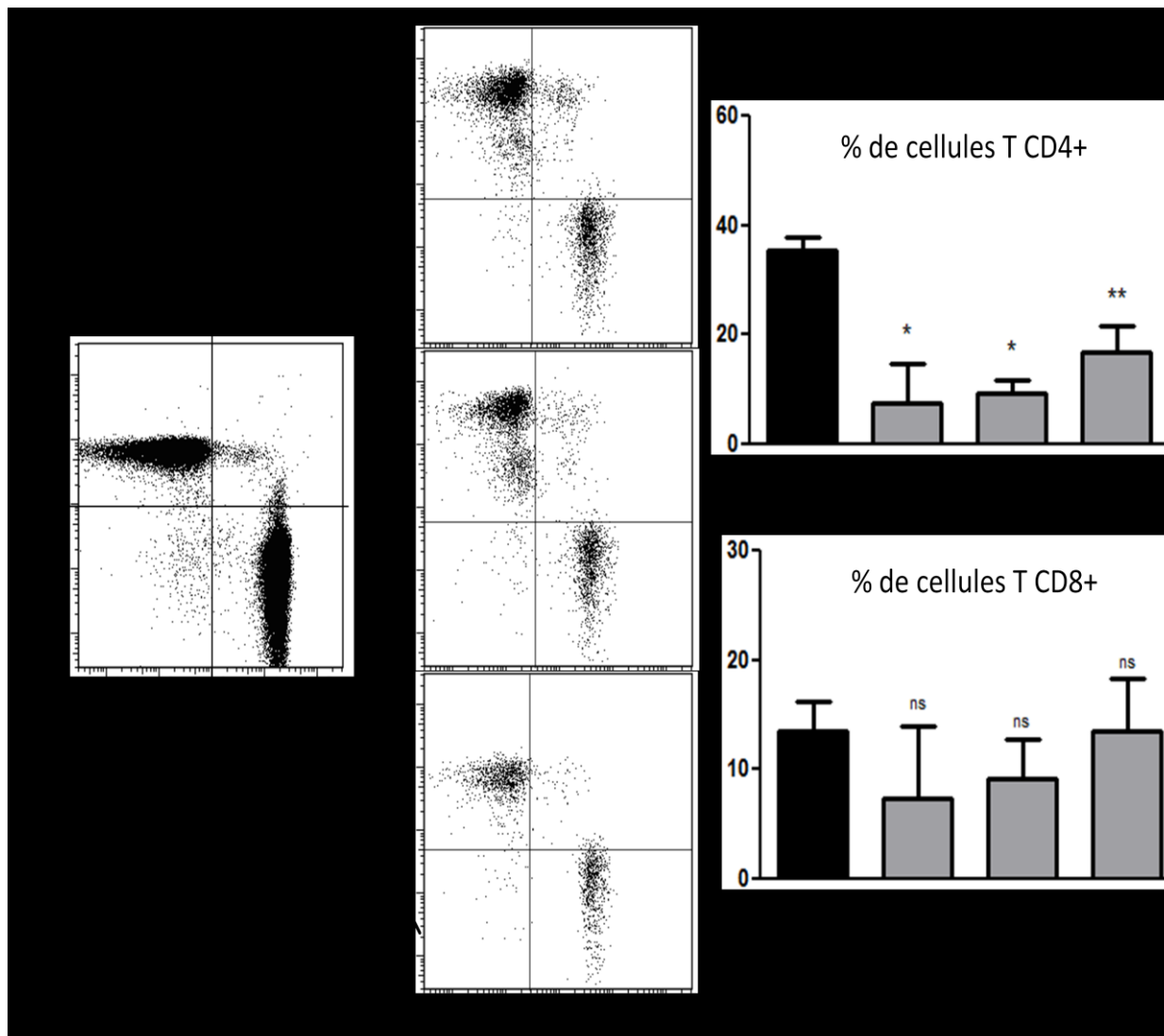


Figure supplémentaire 8. Proportion de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ à 0, 2 et 4 mois post traitement chez les patients allogreffés ayant développés une GVH réfractaire au traitement. A) Analyse en cytométrie en flux des pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ provenant du sang périphérique des patients en GVHc réfractaire. B) Analyse en cytométrie en flux des proportions de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang périphérique des sujets contrôles (noir, n=29) et des receveurs d'allogreffe développant une GVH réfractaire au traitement (gris n=15). Les pourcentages moyens \pm SEM sont représentés. La différence statistique entre les groupes a été évaluée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. (*p<0,05, **p=0,01 et ***p=0,001)

WHO classification of chronic myeloid malignancies	
<p>Myeloproliferative neoplasms (MPN)</p> <p>Chronic myelogenous leukemia, <i>BCR-ABL1</i>-positive</p> <p>Chronic neutrophilic leukemia</p> <p>Polycythemia vera</p> <p>Primary myelofibrosis</p> <p>Essential thrombocythemia</p> <p>Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified</p> <p>Mastocytosis</p> <p>Myeloproliferative neoplasms, unclassifiable</p> <p>Myelodysplastic syndromes (MDS)</p> <p>Refractory cytopenia with unilineage dysplasia</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Refractory anemia ▪ Refractory neutropenia ▪ Refractory thrombocytopenia <p>Refractory anemia with ring sideroblasts</p> <p>Refractory cytopenia with multilineage dysplasia</p> <p>Refractory anemia with excess blasts</p> <p>Myelodysplastic syndrome with isolated del(5q)</p> <p>Myelodysplastic syndrome, unclassifiable</p> <p>Childhood myelodysplastic syndrome</p>	<p>MDS/MPN</p> <p>Chronic myelomonocytic leukemia</p> <p>Atypical chronic myeloid leukemia, <i>BCR-ARI 1</i>-negative</p> <p>Juvenile myelomonocytic leukemia</p> <p>MDS/MPN, unclassifiable, including refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis</p> <p>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and genetic abnormalities</p> <p>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>PDGFRA</i> rearrangement</p> <p>Myeloid neoplasms associated with <i>PDGFRB</i> rearrangement</p> <p>Myeloid and lymphoid neoplasms associated with <i>FGFR1</i> abnormalities</p>

tableau supplémentaire 1: Critères diagnostique des cancers hématologique myéloide chronique de l'organisation mondiale de la santé. inspiré de: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*

Box 2 The 2008 WHO diagnostic criteria ² for PV, ET and PMF*	Primary myelofibrosis major criteria
Polycythemia vera major criteria	Megakaryocyte proliferation and atypia accompanied by reticulin and/or collagen fibrosis; or in the absence of overt fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity and granulocytic proliferation (that is, prefibrotic primary myelofibrosis)
Hemoglobin >18.5 g/dl (men) >16.5 g/dl (women)*	Not meeting WHO criteria for CML, polycythemia vera, MDS, or other myeloid neoplasm
Presence of JAK2 V617F or similar mutation	Presence of JAK2 V617F or other clonal marker or no evidence of reactive marrow fibrosis
Polycythemia vera minor criteria	Primary myelofibrosis minor criteria
Bone marrow trilineage myeloproliferation	Leukoerythroblastosis
Subnormal serum erythropoietin level	Increased serum lactate dehydrogenase
Endogenous erythroid colony growth	Anemia
Essential thrombocythemia major criteria	Palpable splenomegaly
Platelet count $\geq 450 \times 10^9/l$	*Diagnosis of polycythemia vera requires meeting either both major criteria and one minor criterion or the first major criterion and two minor criteria; diagnosis of essential thrombocythemia requires meeting all four major criteria; diagnosis of primary myelofibrosis requires meeting all three major criteria and two minor criteria. *Hemoglobin or hematocrit values above the 99 th percentile of the reference range for age, sex, or altitude of residence; or red cell mass >25% above mean normal predicted or hemoglobin >17 g/dl (men), or >15 g/dl (women) if associated with a sustained increase of ≥ 2 g/dl from baseline that cannot be attributed to correction of iron deficiency. Abbreviations: CML, chronic myelogenous leukemia; ET, essential thrombocythemia; MDS, myelodysplastic syndrome; PMF, primary myelofibrosis; PV, polycythemia vera.
Megakaryocyte proliferation with large and mature morphology	
Not meeting WHO criteria for CML, polycythemia vera, primary myelofibrosis, MDS or other myeloid neoplasm	
Presence of JAK2 V617F or other clonal marker or no evidence of reactive thrombocytosis	

Tableau 2. Critère diagnostique de l'organisation mondiale de la santé pour les PV, ET et PMF. inspiré de: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*

6. Références

¹ Thomas, E. D., Lochte, H. L. Jr, Cannon, J. H., Sahler, O. D. & Ferrebee, J. W. Supra lethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* 38, 1709–1716 (1959).

²Shlomchik WD Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 7(5):340-52. Review (2007).

³ Yang H, Robinson SN, Nieto Y, Jones RJ, Gocke CD, Lu J, Giralt SA, Jones RB, Decker WK, Xing D, Steiner D, Champlin RE, McMannis JD, Ng J, Thomas MW, Shah N, Andersson BS, Parmar S, Shpall EJ. Ex vivo graft purging and expansion of autologous blood progenitor cell products from patients with multiple myeloma. *Cancer Res.* 15;71(14):5040-9. (2011)

⁴.Pettengell R, Schmitz N, Gisselbrecht C, Smith G, Patton WN, Metzner B, Caballero D, Tilly H, Walewski JA, Bence-Bruckler I, To B, Geisler CH, Schots R, Kimby E, Taverna CJ, Kozák T, Dreger P, Uddin R, Ruiz de Elvira C, Goldstone AH. Rituximab purging and/or maintenance in patients undergoing autologous transplantation for relapsed follicular lymphoma: a prospective randomized trial from the lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation *J Clin Oncol.* ;31(13):1624-30.(2013)

⁵ L.K. Hicks, A. Woods, R. Buckstein et al. Rituximab purging and maintenance combined with auto-SCT: long-term molecular remissions and prolonged hypogammaglobulinemia in relapsed follicular lymphoma *Bone Marrow Transplant*, 43 pp. 701–708 (2009).

⁶ Litzow MR. The therapy of relapsed acute leukaemia in adults. *Blood Rev.* 18(1):39-63 (2004).

⁷ Becker, A.J., McCulloch, E.A., and Till, J.E. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature* 197, 452–454 (1963).

⁸ Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 29–36 (1964).

⁹Knudtson, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 43, 357–361 (1974).

¹⁰ Han, P., Hodge, G., Story, C. & Xu, X. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br. J. Haematol.* 89, 733–740 (1995).

¹¹ Godfrey, W. R. et al. Cord blood CD4+CD25+-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105, 750–758 (2005).

¹² Zhang H, Chen J, Que W. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in acute leukemia patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* ;18(8):1164-73. (2012).

¹³ Petersdorf, E.W., *Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation.* *Curr Opin Immunol*, 20(5): p. 588-93 (2008).

¹⁴ Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol.*1(3):404-14 (2006).

¹⁵ Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol.* 47(1):3-12 (2010).

¹⁶ Shi-Xia X, Hai-Qin X, Xian-Hua T, Bo F, Xiang-Feng T. Comparison of reduced intensity and myeloablative conditioning regimens for stem cell transplantation in patients with malignancies: a meta-analysis. *Clin Transplant.* ;25(2):E187-98. (2011)

¹⁷ Sorror ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, Maloney DG, Storb R. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood.*;104(4):961-8.(2004)

¹⁸ Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.*15(12):1628-33 (2009).

¹⁹ Forman SJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia in adults. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23(5):1011-31, vi. Review (2009).

²⁰ Forman SJ. What is the role of reduced-intensity transplantation in the treatment of older patients with AML? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 406-13. Review (2009).

²¹ Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Tauro S, Craddock C, Peggs K, Begum G, Mahendra P, Cook G, Marsh J, Milligan D, Goldstone A, Hunter A, Khwaja A, Chopra R, Littlewood T, Peniket A, Parker A, Jackson G, Hale G, Cook M, Russell N, Mackinnon S. *J Clin Oncol.* 20;23(36):9387-93 (2005).

²²Craddock CF. Full-intensity and reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in AML. *Bone Marrow Transplant.* 41(5):415-23. Review (2008).

²³ Turner BE, Collin M, Rice AM. Reduced intensity conditioning for hematopoietic stem cell transplantation: has it achieved all it set out to? *Cytherapy.* 12(4):440-54. Review (2010).

²⁴ Turner BE, Collin M, Rice AM. ,Reduced intensity conditioning for hematopoietic stem cell transplantation: has it achieved all it set out to? *Cytherapy.* 12(4):440-54. Review (2010).

²⁵ Bachanova V, Brunstein CG, Burns LJ, Miller JS, Luo X, Defor T, Young JA, Weisdorf DJ, Tomblyn M Fewer infections and lower infection-related mortality following non-myeloablative

versus myeloablative conditioning for allotransplantation of patients with lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 43(3):237-44 (2009).

²⁶ Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Chauncey T, McSweeney PA, Little MT, Corey L, Storb R. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood.* 99(6):1978-85 (2002).

²⁷ Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens.* 79(2):83-9 (2012).

²⁸ Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A et al. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 30: 366–73 (2009).

²⁹ Wu, L., Antica, M., Johnson, G. R., Scollay, R. & Shortman, K. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J. Exp. Med.* 174, 1617–1627 (1991).

³⁰ von Boehmer, H. The developmental biology of T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 309–326 (1988).

³¹ von Boehmer, H. & Fehling, H. J. Structure and function of the pre-T cell repertoire. *Ann. Rev. Immunol.* 15, 433–452 (1997).

³² Jameson, S. C., Hogquist, K. A. & Bevan, M. J. Positive selection of thymocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 13, 93–126 (1995).

³³ Palmer, E. Negative selection — clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature Rev. Immunol.* 3, 383–391 (2003).

-
- ³⁴ Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunol.* 4, 330–336 (2003).
- ³⁵ Sutherland JS, Goldberg GL, Hammett MV, Uldrich AP, Berzins SP, Heng TS, Blazar BR, Millar JL, Malin MA, Chidgey AP et al.: Activation of thymic regeneration in mice and humans following androgen blockade. *J Immunol.* 175:2741-2753 (2005).
- ³⁶ Sempowski GD, et al. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J. Immunol.* 164:2180–2187 (2000).
- ³⁷ Jamieson BD, et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity.* 10:569– 575 (1999).
- ³⁸ Gray DH, Seach N, Ueno T, Milton MK, Liston A, Lew AM, Goodnow CC, Boyd RL: Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood.* 108:3777-3785 (2006).
- ³⁹ Heng TS, Chidgey AP, Boyd RL. Getting back at nature: understanding thymic development and overcoming its atrophy. *Curr Opin Pharmacol.* 2010(4):425-33 (2010)
- ⁴⁰ Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383(6603):787-93. (1996).
- ⁴¹ Waterstrat A, Van Zant G: Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Immunol.* 21:408-413 (2009).
- ⁴² Mackall CL, Punt JA, Morgan P, Farr AG, Gress RE: Thymic function in young/old chimeras: substantial thymic T cell regenerative capacity despite irreversible age-associated thymic involution. *Eur J Immunol.* 28:1886-1893 (1998).

-
- ⁴³ Chen BJ, Deoliveira D, Spasojevic I et al. Growth hormone mitigates against lethal irradiation and enhances hematologic and immune recovery in mice and nonhuman primates. *PLoS One* 2.5: e11056 (2010).
- ⁴⁴ Nobori S, Shimizu A, Okumi M, Samelson-Jones E, Griesemer A, Hirakata A, Sachs DH, Yamada K: Thymic rejuvenation and the induction of tolerance by adult thymic grafts. *Proc Natl Acad Sci* . 103:19081-19086 (2006).
- ⁴⁵ Storek J, Joseph A, Espino G, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* .98:3505–3512 (2001).
- ⁴⁶ Le RQ, Melenhorst JJ, Battiwalla M, et al. Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2011; 117:5250–5256.
- ⁴⁷ Storek J, Joseph A, Dawson MA, et al. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* .73:1154–1158 (2002).
- ⁴⁸ Schimmelpfennig CH, Schulz S, Arber C, Baker J, Turner I, McBride J, Contag CH, Negrin RS. Ex vivo expanded dendritic cells home to T-cell zones of lymphoid organs and survive in vivo after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Pathol*. 167(5):1321-31 .(2005).
- ⁴⁹ Kalina T, Lu H, Zhao Z, et al. De novo generation of CD4 T cells against viruses present in the host during immune reconstitution. *Blood*. 105:2410–2414 (2005).
- ⁵⁰ Storek J, Witherspoon RP, Storb R. T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplant*. 16:413– 425 (1995).
- ⁵¹ Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* . 97:1458–1466 (2001).

-
- ⁵² Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *J Exp Med*. 19;29(6):848-62 (2008).
- ⁵³ Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *J Eur J Immunol*. 39(8):2088-94 (2009).
- ⁵⁴ Caserta S, Zamoyska R. Memories are made of this: synergy of T cell receptor and cytokine signals in CD4(+) central memory cell survival. *Trends Immunol*. 28(6):245-8 (2007).
- ⁵⁵ Brown JA, Stevenson K and Kim HT. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 115:4111–4119 (2010).
- ⁵⁶ Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, et al. Immune reconstitution after antithymocyte globulin (ATG)-conditioned hematopoietic cell transplantation (HCT). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2011; 118:abstr (1981).
- ⁵⁷ Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2;373(9674):1550-61 (2009).
- ⁵⁸ Banovic T, Markey KA, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Don AL, Degli-Esposti MA, Engwerda CR, MacDonald KP, Hill GR. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 182(2):912-20 (2009).
- ⁵⁹ Moller, J., et al., Defective T-cell stimulatory pathways in patients after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in man. *APMIS*, 1993. 101(6): p. 480-6.
- ⁶⁰ Morecki, S., et al., Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen. *Bone Marrow Transplant*, 2001. 28(3): p. 243-9

⁶¹ Symann, M., et al., Immune reconstitution after bone-marrow transplantation. *Cancer Treat Rev*, 1989. 16 Suppl A: p. 15-9.

⁶² Spitzer, T.R., Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 390-5

⁶³ Mir, M.A. and M. Battiwalla, Immune deficits in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Mycopathologia*, 2009. 168(6): p. 271-82.

⁶⁴ Scott, B. L. Myeloablative vs nonmyeloablative allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia with multilineage dysplasia: a retrospective analysis. *Leukemia* 20, 128–135 (2006).

⁶⁵ Loiseau, P., Busson, M., Balere, M.-L., Dormoy, A., Bignon, J.-D., Gagne, K., Gebuhrer, L., Dubois, V., Jollet, I., Bois, M., et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol. Blood Marrow Transplant* 13, 965-974 (2007).

⁶⁶ Flomenberg, N., Baxter-Lowe, L. A., Confer, D., Fernandez-Vina, M., Filipovich, A., Horowitz, M., Hurley, C., Kollman, C., Anasetti, C., Noreen, H., et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104, 1923-1930 (2004).

⁶⁷ Shaw, B. E., Arguello, R., Garcia-Sepulveda, C. A., et Madrigal, J. A. The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 150, 251-258 (2010).

⁶⁸ Cahn, J.-Y., Klein, J. P., Lee, S. J., Milpied, N., Blaise, D., Antin, J. H., Leblond, V., Ifrah, N., Jouet, J.-P., Loberiza, F., et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-

TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 106, 1495-1500 (2005).

⁶⁹ Wang X, Li H, Matte-Martone C, et al. Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-vs-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood*. 118(24):6426-6437 (2011).

⁷⁰ Amarnath S, Costanzo CM, Mariotti J, et al. Regulatory T cells and human myeloid dendritic cells promote tolerance via programmed death ligand-1. *PLoS Biol.* 8(2):e1000302 (2010).

⁷¹ Wang X, Li H, Matte-Martone C, et al. Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-vs-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood*. 118(24):6426-6437 (2011).

⁷² Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute Graft versus Host Disease. *Blood* .80:2964-8 (1992).

⁷³ Ferrara JL. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol.*5(5):794-9 (1993).

⁷⁴ Via CS, Finkelman FD. Critical role of interleukin 2 in the development of acute graft-versus-host disease. *Int Immunol* .5:565-72 (1993).

⁷⁵ Fowler DH. Donor CD4-enriched cells of Th2 cytokine phenotype regulate graft versus host disease without impairing allo-geneic engraftment in sublethally irradiated mice. *Blood* .84(10):3540-9 (1994).

⁷⁶ Hill, G. R., et Ferrara, J. L. 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* 95, 2754-2759 (2000).

⁷⁷ Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol*. 13:426–435 (2006).

⁷⁸ Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*. 100:406–414 (2002).

⁷⁹ Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 12:31–47 (2006).

⁸⁰ 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*. 11:945–956 (2005).

⁸¹ Lee SJ. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 105:4200–4206 (2005).

⁸² Filipovich AH. Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 21(2):251-7 (2008).

⁸³ Appelbaum, F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411,385–389 (2001).

⁸⁴ Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med*. 10(9):987-992 (2004).

⁸⁵ Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigenpresenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med*. 11(11):1244-1249 (2005).

⁸⁶ Perreault C. In search of immunodominant minor histocompatibility antigens. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19(2):171-2 (2013).

⁸⁷ Bleakley, M. & Riddell, S.R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* 4, 371–380 (2004).

⁸⁸ Fontaine, P. et al. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat. Med.* 7, 789–794 (2001).

⁸⁹ Mapara MY, Kim YM, Wang SP, Bronson R, Sachs DH, Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood.* 100(5):1903-1909 (2002).

⁹⁰ Durakovic N, Radojic V, Skarica M, et al. Factors governing the activation of adoptively transferred donor T cells infused after allogeneic bone marrow transplantation in the mouse. *Blood.* 109(10):4564-4574 (2007).

⁹¹ Peggs KS, Thomson K, Hart DP, et al. Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. *Blood.* 103(4): 1548-1556 (2004).

⁹² Apperley, J. F. et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: importance of a graft-versus-leukaemia effect. *Br. J. Haematol.* 69, 239–245 (1988).

⁹³ Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol.* 25(31): 4938-4945 (2007).

-
- ⁹⁴ Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 86(5):2041-2050 (1995).
- ⁹⁵ Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148 (2004).
- ⁹⁶ Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* .139:380–97 (1974).
- ⁹⁷ Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*.137:1142–62 (1973).
- ⁹⁸ Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch* .44:325–37 (1868).
- ⁹⁹ Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* .392:245–52 (1998).
- ¹⁰⁰ Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* .90:3245–87 (1990).
- ¹⁰¹ Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* .86:439–52 (2008).
- ¹⁰² Palframan RT, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* .194:1361 (2001).
- ¹⁰³ Geissmann F, et al. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunology and cell biology* .86:398–408 (2008).

¹⁰⁴ De Baey, A., Mende, I., Baretton, G., Greiner, A., Hartl, W. H., Baeuerle, P. A. and Diepolder, H. M., A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J. Immunol.* 2003. 170: 5089–5094 (2003).

¹⁰⁵ Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity.*26:519– 531 (2007).

¹⁰⁶ Hideki Nakano, Kaifeng Lisa Lin, Manabu Yanagita, Chantal Charbonneau, Donald N. Cook, Terutaka Kakiuchi, and Michael D. Gunn Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute TH1 immune responses *Nat Immunol.* 10(4): 394–402 (2009).

¹⁰⁷ Boring L, et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.*100:2552–2561 (1997).

¹⁰⁸ Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L. & Manz, M.G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198, 305–313 (2003).

¹⁰⁹ Lebre MC, Tak PP. Dendritic cells in rheumatoid arthritis: Which subset should be used as a tool to induce tolerance? *Hum Immunol.*70(5):321–4 (2009).

¹¹⁰ Saraiva, M. and O’Garra, A., The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 170–181 (2010).

¹¹¹ Banchereau J, Klechevsky E, Schmitt N, Morita R, Palucka K, Ueno H. Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Ann N Y Acad Sci.*1174:24–32 (2009).

¹¹² Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.*70:83–243 (1998).

-
- ¹¹³ Bamboat, Z. M., Stableford, J. A., Plitas, G., Burt, B. M., Nguyen, H. M., Welles, A. P., Gonen, M. et al., Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J. Immunol.* 182: 1901–1911 (2009).
- ¹¹⁴ Efron, P. A., Martins, A., Minnich, D., Tinsley, K., Ungaro, R., Bahjat, F. R., Hotchkiss, R. et al., Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 173: 3035–3043 (2004).
- ¹¹⁵ Fujita, S., Seino, K., Sato, K., Sato, Y., Eizumi, K., Yamashita, N., Taniguchi, M. et al., Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* . 107: 3656–3664 (2006).
- ¹¹⁶ Jongbloed, S. L., Kassianos, A. J., McDonald, K. J., Clark, G. J., Ju, X., Angel, C. E., Chen, C. J. et al., Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207: 1247–1260 (2010).
- ¹¹⁷ Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A. et al., Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207: 1273–1281 (2010).
- ¹¹⁸ Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest.* 118(6):2098-2110 (2008).
- ¹¹⁹ Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM, Brown GD. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem.* 283(24):16693-16701 (2008).

¹²⁰ Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Teh JS, Lo JCY et al. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*. 112(8):3264-3273 (2008).

¹²¹ Poulin, L. F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J. L., Keller, A. M. et al., Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha +dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207: 1261–1271 (2010).

¹²² O’Keeffe, M. et al. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous insurface phenotype and function, that differentiate into CD8+dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196, 1307–1319 (2002).

¹²³ Trinchieri, G., Santoli, D., Dee, R.R. & Knowles, B.B. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J. Exp. Med.* 147, 1299–1313 (1978).

¹²⁴ Perussia, B., Fanning, V. & Trinchieri, G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro α interferon production in response to viruses. *Nat. Immunol. Cell Growth Regul.* 4, 120–137 (1985).

¹²⁵ Chen, W. et al. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 103, 2547–2553 (2004).

¹²⁶ Brawand, P. et al. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 169, 6711–6719 (2002).

¹²⁷ Pulendran, B. et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilized distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* 165, 566–572 (2000).

¹²⁸ Arpinati, M., Green, C.L., Heimfeld, S., Heuser, J.E. & Anasetti, C. Granulocyte colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95, 2484–2490 (2000).

¹²⁹ Rissoan, M.C. et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100, 3295–3303 (2002).

¹³⁰ Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, Biron CA, Kastner P, Chan Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood*.108(13):4025-34 (2006).

¹³¹ D'Amico, A. & Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med.* 198, 293–303 (2003).

¹³² Shigematsu, H. et al. Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43–53 (2004).

¹³³ Grouard, G. et al. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185, 1101–1111 (1997).

¹³⁴ Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987-95 (2004).

¹³⁵ Bandyopadhyay, S., Perussia, B., Trinchieri, G., Miller, D.S. & Starr, S.E. Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J. Exp. Med.* 164, 180–195 (1986).

¹³⁶ Agnello, D. et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* 23, 147–161 (2003).

-
- ¹³⁷ Poeck, H. et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 103, 3058–3064 (2004).
- ¹³⁸ Fonteneau, J.F. et al. Activation of influenza virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101, 3520–3526 (2003).
- ¹³⁹ Megjugorac, N.J., Young, H.A., Amrute, S.B., Olshalsky, S.L. & Fitzgerald-Bocarsly, P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukoc. Biol.* 75, 504–514 (2004).
- ¹⁴⁰ Fiebiger, E. et al. Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 881–92 (2001).
- ¹⁴¹ LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Reis e Sousa, C., Acha-Orbea, H. & Reith, W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* 5, 899–908 (2004).
- ¹⁴² Ito, T. et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J. Immunol.* 172, 4253–4259 (2004).
- ¹⁴³ Kuwana, M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* 63, 1156–1163 (2002).
- ¹⁴⁴ Bilsborough, J., George, T.C., Norment, A. & Viney, J.L. Mucosal CD8 α ⁺ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108, 481–492 (2003).
- ¹⁴⁵ 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).

¹⁴⁶ Liu, Y.J., Kanzler, H., Soumelis, V. & Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2, 585–589 (2001).

¹⁴⁷ Fallarino, F. et al. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* 173, 3748–3754 (2004).

¹⁴⁸ De Heer, H.J. et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 200, 89–98 (2004).

¹⁴⁹ Caux C, Dezutier-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258. (1992).

¹⁵⁰ Reid C D, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34⁺ progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.* 149: 2681. (1992).

¹⁵¹ Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman R M, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods* 196: 121 (1996).

¹⁵² Markowicz S, Engleman E G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 85: 955 (1990).

¹⁵³ Caux C, Favre C, Saeland S, Duvert V, Durand I, Mannoni P, Banchereau J. Potentiation of early hematopoiesis by tumor necrosis factor- α is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation. *Blood* 78: 635 (1991).

¹⁵⁴ Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P O, Steinman R M, Schuler G. Proliferating dendritic cells progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180: 83 (1994).

¹⁵⁵ hortman K, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. (Review) *Stem Cells* 15: 409 (1997).

¹⁵⁶ Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt V L, Mohle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92: 4238 (1998).

¹⁵⁷ Flores-Romo L, Bjorck P, Duvert V, van Kooten C, Saeland S, Banchereau J CD40 ligation on human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 185: 341 (1997).

¹⁵⁸ Kamps A W, Hendriks D, Smit J W, Vellenga E. 1999. Role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and expansion of monocytes and dendritic cells from CD34⁺ progenitor cells. *Med. Oncol.* 16: 46 (1999).

¹⁵⁹ Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski C R, Hoek J, Caron D, Lebsack M E, McKenna H J. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96: 878 (2000).

¹⁶⁰ Shurin M R, Pandharipande P P, Zorina T D, Haluszczak C, Subbotin V M, Hunter O, Brumfield A, Storkus W J, Maraskovsky E, Lotze M T. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell Immunol.* 179: 174 (1997).

¹⁶¹ Strobl H, Bello-Fernandez C, Riedl E, Pickl W F, Majdic O, Lyman S D, Knapp W. Flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of

Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90: 1425 (1997).

¹⁶² Brasel K, De Smedt T, Smith J L, Maliszewski C R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96: 3029 (2000).

¹⁶³ Parajuli P, Mosley R L, Pisarev V, Chavez J, Ulrich A, Varney M, Singh R K, Talmadge J E. Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor preferentially expand and stimulate different dendritic and T cell subsets. *Exp. Hematol.* 29: 1185 (2001).

¹⁶⁴ Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Durand I, Banchereau J. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87: 2376 (1996).

¹⁶⁵ Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu Y J. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34⁺ hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192: 1785 (2000).

¹⁶⁶ Sato M, Iwakabe K, Ohta A, Sekimoto M, Nakui M, Koda T, Kimura S, Nishimura. T Functional heterogeneity among bone marrow-derived dendritic cells conditioned by T(h)1- and T(h)2-biasing cytokines for the generation of allogeneic cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12: 335 (2000).

¹⁶⁷ Storozynsky E, Woodward J G, Frelinger J G, Lord E M. Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance the generation and function of dendritic cells. *Immunology* 97: 138 (1999).

¹⁶⁸ Kamps A W, Hendriks D, Smit J W, Vellenga E. Role of macrophage colony-stimulating factor in the differentiation and expansion of monocytes and dendritic cells from CD34⁺ progenitor cells. *Med. Oncol.* 16: 46 (1999).

-
- ¹⁶⁹ Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu M C, Bain C, Facrot M C, Caux C, Blay Y J. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34⁺ progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92: 4778 (1998).
- ¹⁷⁰ Takahashi K, Honeyman M C, Harrison L C. Dendritic cells generated from human blood in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-7. *Hum. Immunol.* 55: 103 (1997).
- ¹⁷¹ Marquez C, Trigueros C, Fernandez E, Toribio M L. The development of T and non-T cell lineages from CD34⁺ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J. Exp. Med.* 181: 475 (1995).
- ¹⁷² Li L, Masucci M G, Levitsky V. Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. *Scand J. Immunol.* 51: 361 (2000).
- ¹⁷³ Varas A, Vicente A, Sacedon R, Zapata A G. Interleukin-7 influences the development of thymic dendritic cells. *Blood* 92: 93 (1998).
- ¹⁷⁴ Fukao T, Koyasu S. Expression of functional IL-2 receptors on mature splenic dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 1453 (2000).
- ¹⁷⁵ Bernhard H, Lohmann M, Batten W Y, Metzger J, Lohr H F, Peschel C, zum Buschenfelde K M, Rose-John S. The gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL-6 promotes the expansion of human hematopoietic progenitor cells capable to differentiate into functional dendritic cells. *Exp. Hematol.* 28: 365 (2000).
- ¹⁷⁶ Bernhard H, Huseby E S, Hand S L, Lohmann M, Batten W Y, Disis M L, Gralow J R, Meyer zum Buschenfelde K H, Ohlen C, Cheever M A. Dendritic cells lose ability to present protein antigen after stimulating antigen-specific T cell responses, despite upregulation of MHC class II expression. *Immunobiology* 201: 568 (2000).

-
- ¹⁷⁷ Brasel K, De Smedt T, Smith J L, Maliszewski C R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96: 3029 (2000).
- ¹⁷⁸ Esche C, Cai Q, Peron J M, Hunter O, Subbotin V M, Lotze M T, Shurin M R. Interleukin-12 and Flt3 ligand differentially promote dendropoiesis in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30: 2565 (2000).
- ¹⁷⁹ Grohmann U, Orabona C, Bianchi R, Belladonna M L, Fioretti M C, Puccetti P. IL-12 induces SDS-stable class II alphabeta dimers in murine dendritic cells. *Cytokine* 12: 401 (2000).
- ¹⁸⁰ Piemonti L, Bernasconi S, Luini W, Trobonjaca Z, Minty A, Allavena P, Mantovani A. IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur. Cytokine Netw.* 6: 245 (1995).
- ¹⁸¹ Lopez M, Amorim L, Gane P, Cristoph A, Bardinet D, Abina A M, Minty A, Bernard J. IL-13 induces CD34⁺ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J. Immunol. Methods* 208: 117 (1997).
- ¹⁸² S. Feau, V. Facchinetti, F. Granucci, S. Citterio, D. Jarrossay, S. Seresini, M.P. Protti, A. Lanzavecchia, P. Ricciardi-Castagnoli Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice *Blood*, 105, pp. 697–702 (2005).
- ¹⁸³ T. Ohteki, K. Suzue, C. Maki, T. Ota, S. Koyasu Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response *Nat. Immunol.*, 12 pp. 1138–1143 (2001).
- ¹⁸⁴ Anguille, S. et al. Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *J. Transl. Med.* 7, 109 (2009).
- ¹⁸⁵ Budagian, V. et al. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 259–280 (2006).

-
- ¹⁸⁶ Caux C, Massacrier C, Dubois B, Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Durand I, Schmitt D, Saeland S. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34⁺ progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 66: 781 (1999).
- ¹⁸⁷ Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science.* 285(5426):412-415 (1999).
- ¹⁸⁸ Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol.* 172(12):7393-7398 (2004).
- ¹⁸⁹ Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med.* 10(9):987-992 (2004).
- ¹⁹⁰ 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.* 10(5): 510-517 (2004).
- ¹⁹¹ Li H, Kaplan DH, Matte-Martone C, et al. Langerhans cells are not required for graft-versus-host disease. *Blood.* 117(2):697-707 (2011).
- ¹⁹² Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood.* 105(5):2227-2234 (2005).
- ¹⁹³ Zhao D, Young JS, Chen YH, et al. Alloimmune response results in expansion of autoreactive donor CD4⁺ T cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J Immunol.* 186(2):856-868 (2011).

-
- ¹⁹⁴ 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.* 179(5):3305-3314 (2007).
- ¹⁹⁵ R. Korngold, J. Sprent Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice Prevention by removing mature T cells from marrow *J Exp Med.* pp. 1687–1698 (1978).
- ¹⁹⁶ Gould, D. S. & Auchincloss, H. Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol. Today* 20, 77–82 (1999).
- ¹⁹⁷ Herrera, O. B. et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 4828–4837 (2004).
- ¹⁹⁸ M. Bleakley, S.R. Riddell Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect *Nat Rev Cancer*, 4 pp. 371–380 (2004).
- ¹⁹⁹ They, C. et al. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunol.* 3, 1156–1162 (2002).
- ²⁰⁰ Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. & Barratt-Boyes, S. M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* 166, 3717–3723 (2001).
- ²⁰¹ Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Rev. Immunol.* 7, 19–30 (2007).
- ²⁰² Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, Seissler J, Schott M. Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. *HormMetab Res.* 40:99–107 (2008).

-
- ²⁰³ Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445–480 (1989).
- ²⁰⁴ Lu, L., McCaslin, D., Starzl, T. E. & Thomson, A. W. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145⁺, MHC class II⁺, B7-1 dim, B7-2⁻) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* 60, 1539–1545 (1995).
- ²⁰⁵ Fu, F. et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II⁺, CD80 dim, CD86⁻) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* 62, 659–665 (1996).
- ²⁰⁶ Lutz, M. B. et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30, 1813–1822 (2000).
- ²⁰⁷ Cong, Y. et al. Generation of antigen-specific, Foxp3-expressing CD4⁺ regulatory T cells by inhibition of APC proteasome function. *J. Immunol.* 174, 2787–2795 (2005).
- ²⁰⁸ Wakkach, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605–617 (2003).
- ²⁰⁹ Yamazaki, S. et al. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198, 235–247 (2003).
- ²¹⁰ Yamazaki, S. et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 2758–2763 (2006).

-
- ²¹¹ Tarbell, K. V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P. & Steinman, R. M. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 199, 1467–1477 (2004).
- ²¹² Matte CC, Liu J, Cormier J, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med.* 10:987-992 (2004).
- ²¹³ Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 4(5):371-80 (2004).
- ²¹⁴ Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest.* ;117(5):1195-203 (2007).
- ²¹⁵ Molldrem, J. et al. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood* 88, 2450–2457 (1996).
- ²¹⁶ 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.* 16(6):854-860 (2010).
- ²¹⁷ Eaves, C., Cashman, J. & Eaves, A. Defective regulation of leukemic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 22, 1085–1096 (1998).
- ²¹⁸ Jerald P. Radich The Biology of Chronic Myelogenous Leukemia Progression: Who, What, Where, and Why? *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 25; 5:967–980 (2011).
- ²¹⁹ Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 113(15):3418-27 (2009).
- ²²⁰ Deininger MW, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev.* 55:401 – 423 (2003).

-
- ²²¹ Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.*344:1038 – 1042 (2001).
- ²²² Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest.*121: 396–409 (2011).
- ²²³ Mahon, F. et al. Selection and characterization of BCR–ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*96, 1070–1079 (2000).
- ²²⁴ Weisberg, E. & Griffin, J. Mechanism of resistance to the Abl tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL transformed hematopoietic cell lines. *Blood*95, 3498–3505 (2000).
- ²²⁵ Gorre, M. E. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR–ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876–880 (2001).
- ²²⁶ Hochhaus, A. et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293, 2163a (2001).
- ²²⁷ Hofmann, W. K. et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and geneexpression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 359, 481–486 (2002).
- ²²⁸ Appelbaum, F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 411, 385–389 (2001).

²²⁹ Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. crucial role for antigen presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med.* 11(11):1244-9 (2005).

²³⁰ Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89–95 (1998).

²³¹ Croft, M., Bradley, L.M. & Swain, S.L. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J. Immunol.* 152, 2675–2685 (1994).

²³² Kedl, R.M. & Mescher, M.F. Qualitative differences between naive and memory T cells make a major contribution to the more rapid and efficient memory CD8+ T cell response. *J. Immunol.* 161, 674–683 (1998).

²³³ Sprent, J. T memory cells: quality not quantity. *Curr. Biol.* 12, R174–R176 (2002).

²³⁴ Mintern, J.D. et al. Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 168, 977–980 (2002).

²³⁵ Scheich F, Duyster J, Peschel C, Bernhard H. The immunogenicity of Bcr-Abl expressing dendritic cells is dependent on the Bcr-Abl kinase activity and dominated by Bcr-Abl regulated antigens. *Blood.* 110(7):2556-60 (2007).

²³⁶ Chen W, Peace DJ, Rovira DK, You S-G, Cheever MA. T-cell immunity to the joining region of p210 Bcr-Abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1468-1472 (1992).

²³⁷ Clark RE, Dodi IA, Hill SC, et al. Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein. *Blood.* 98:2887-2893 (2001).

²³⁸ Posthuma EF, van Bergen CA, Kester MG, et al. Proteosomal degradation of BCR/ABL protein can generate an HLA-A*0301-restricted peptide, but high-avidity T cells recognizing this leukemia-specific antigen were not demonstrated. *Haematologica*. 89:1062-1071 (2004).

²³⁹ Bocchia M, Gentili S, Abruzzese E, et al. Effect of a p210 multipeptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet*. 365:657-662 (2005).

²⁴⁰ Dengler R, Munstermann U, al-Batran S, et al. Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br J Haematol*. 89: 250-257 (1995).

²⁴¹ Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*.6:1018-1023 (2001).

²⁴² Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, et al. Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia*. 16:2238-2242 (2002).

²⁴³ Gahrton, G., H. Svensson, M. Cavo, J. Apperly, A. Bacigalupo, B. Björkstrand, J. Blade', J. Cornelissen, A. de Laurenti, T. Facon, et al; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983–93 and 1994–8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br. J. Haematol*. 113: 209–216 (2001).

²⁴⁴ McGlave, P. Bone marrow transplants in chronic myelogenous leukemia: an overview of determinants of survival. *Semin. Hematol*. 27(3, Suppl. 4)23–30 (1990).

²⁴⁵ Porter, D. L., R. H. Collins, Jr., C. Hardy, N. A. Kernan, W. R. Drobyski, S. Giralt, M. E. Flowers, J. Casper, A. Leahey, P. Parker, et al. Treatment of relapsed leukemia after unrelated

donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood* 95: 1214–1221 (2000).

²⁴⁶ Horowitz, M.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555–562 (1990).

²⁴⁷ Kolb, H.J. et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. *Blood* 86, 2041–2050 (1995).

²⁴⁸ Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E: Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol.*12: 125–135 (2012).

²⁴⁹ Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K: Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med.*202: 637–650 (2005).

²⁵⁰ Garcia-Sastre A, Biron CA: Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.*312: 879–882 (2006).

²⁵¹ Gonzalez-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E: Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol.*12: 125–135 (2012).

²⁵² Garcia-Sastre A, Biron CA: Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.*312: 879–882 (2006).

²⁵³ Appel S, Rupf A, Weck MM, et al. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor- κ B and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res.*11:1928-1940 (2005).

-
- ²⁵⁴ Appel S, Rupf A, Weck MM, Schoor O, Brummendorf TH, Weinschenk T, Grunebach F, Brossart P. Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clin Cancer Res* 11:1928–1940 (2005)
- ²⁵⁵ Gao H, Lee BN, Talpaz M, Donato NJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Reuben JM. Imatinib mesylate suppresses cytokine synthesis by activated CD4 T cells of patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 19:1905–1911 (2005)
- ²⁵⁶ Dietz A, Souan L, Knutson G, Bulur P, Litzow M, VukPavlovic S . Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood* 104:1094–1099 (2004).
- ²⁵⁷ Appel S, Balabanov S, Brummendorf TH, Brossart P . Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem Cells* 23:1082–1088 (2005).
- ²⁵⁸ Wang H, Cheng F, Cuenca A, Horna P, Zheng Z, Bhalla K, Sotomayor EM. Imatinib mesylate (STI-571) enhances antigen presenting cell function and overcomes tumorinduced CD4 + T-cell tolerance. *105:1135 – 1143* (2005).
- ²⁵⁹ Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov.* 1:493 – 502 (2002).
- ²⁶⁰ Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immuneresponse. *Annu Rev Immunol* .20:55 – 72 (2002).
- ²⁶¹ Appel S, Boehmler AM, Grunebach F, Muller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brummendorf TH, Brossart P. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34 + peripheral blood progenitor cells. *Blood* .103:538 – 544 (2004).

²⁶² Taieb J, Maruyama K, Borg C, Terme M, Zitvogel L. Imatinib mesylate impairs Flt3L-mediated dendritic cell expansion and antitumor effects in vivo. *Blood* .103:1966 – 1967 (2004).

²⁶³ Mohty M, Jourdan E, Mami NB, Vey N, Damaj G, Blaise D, Isnardon D, Olive D, Gaugler B. Imatinib and plasmacytoid dendritic cell function in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* .103:4666 – 4668 (2004).

²⁶⁴ Alvaro Urbano-Ispizua Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Stem cell source. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 20, 2; 265-280 (2007).

²⁶⁵ Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* .100(5):1734-41. (2002)

²⁶⁶ Merad M. Ontogeny of Langerhans cells and graft versus host disease. *Adv Exp Med Biol* .560: 115–23 (2005).

²⁶⁷ Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Histochem Cell Biol*. 106(5):481-5 (1996).

²⁶⁸ Emerson SG. Tanning before transplant: lancing the Langerhans cell. *Nat Med* .5: 451–2 (2004).

²⁶⁹ 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*. 5: 510–7 (2004).

²⁷⁰ 38 Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M. et al., Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumordraining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 2570–2582 (2007).

²⁷¹ Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F. and Angeli, V. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7: 652–662 (2006).

²⁷² Ouabed, A., Hubert, F. X., Chabannes, D., Gautreau, L., Heslan, M. and Josien, R., Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 5862–5870 (2008).