



Université de Montréal

**Impact de la maladie du greffon contre l'hôte sur la  
reconstitution immunitaire suite à une transplantation  
allogénique de cellules souches hématopoïétiques**

par

Simon-David Gauthier

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en microbiologie, infectiologie et immunologie

Juin 2015

© Simon-David Gauthier, 2015



## Résumé

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (ASCT) est couramment utilisée pour traiter différents cancers hématologiques. Malheureusement, l'effet bénéfique de cette technique est limité par la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) qui demeure la cause principale de mortalité post-greffe. La GVHD endommage différents organes et retarde la reconstitution immunitaire des lymphocytes T (LT) ce qui augmente les risques d'infection et de rechute. Le développement de nouveaux traitements permettant d'accélérer la reconstitution immunitaire augmenterait donc les chances de survie des patients greffés. Il existe deux façons de régénérer des LT: via la thymopoïèse qui consiste à produire de nouveaux LT, ou par la prolifération homéostatique (PH) qui implique l'expansion rapide des LT matures retrouvés dans le greffon. La PH requiert deux signaux essentiels: l'interleukine-7 (IL-7) et la présentation d'antigènes du soi par les cellules dendritiques (DC) via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I pour les LT CD8<sup>+</sup> et le CMH II pour les LT CD4<sup>+</sup>. Dans un contexte d'ASCT, la chimiothérapie et la GVHD endommagent le thymus rendant la thymopoïèse inefficace. Par conséquent, la reconstitution immunitaire repose presque entièrement sur la PH des LT.

L'objectif de cette thèse était de comprendre comment la GVHD affecte la reconstitution des LT. Grâce à un modèle murin, nous avons démontré que la PH des LT CD4<sup>+</sup> est absente durant la GVHD et ce, dû à de faibles niveaux d'IL-7 et une diminution du nombre de DC. La perte des DC est en grande partie causée par des niveaux réduits de *stromal derived factor-1α* (SDF-1α) et par l'absence de progéniteurs de DC dans la moelle osseuse des souris en GVHD. Le traitement des souris en GVHD avec du SDF-1α permet d'augmenter le nombre de DC, et lorsqu'administré avec l'IL-7, améliore significativement la PH des LT CD4<sup>+</sup>. Contrairement aux LT CD4<sup>+</sup>, l'administration d'IL-7 seule est suffisante pour restaurer la PH des LT CD8<sup>+</sup> durant la GVHD et ce, même en absence des DC. Ces différences s'expliquent pour deux raisons : 1) l'expression du CMH I, contrairement au CMH II, n'est pas limitée aux DC mais est également exprimée par les cellules stromales du receveur ce qui est suffisant pour induire la PH des LT CD8<sup>+</sup> et 2) les LT CD8<sup>+</sup> répondent à des concentrations plus faibles d'IL-7 systémique comparativement aux LT CD4<sup>+</sup>.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats permettra de mettre en place des études translationnelles sur le potentiel thérapeutique du SDF-1α et de l'IL-7 dans la reconstitution immunitaire des patients greffés.

**Mots clés :** GVHD, reconstitution immunitaire, lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, lymphocyte T CD8<sup>+</sup>, cellule dendritique, prolifération homéostatique, interleukine-7, SDF-1α.

## Abstract

Hematological cancers are currently treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (ASCT). Unfortunately, graft-versus-host disease (GVHD) greatly limits the health benefits of this procedure, as it is the main cause of mortality post-ASCT. GVHD damages various organs and delays the immune reconstitution of T lymphocytes (TL), which increases the risk of infections and relapse. Thus, developing new treatments modulating the immune reconstitution following ASCT would greatly enhance survival of the transplanted patients. TL can be regenerated by two ways: *de novo* production of TL by thymopoiesis; or homeostatic proliferation (HP), which consists of rapidly expanding mature TL already present in the graft. HP requires two crucial signals: interleukin-7 (IL-7) and self-antigen presentation by dendritic cells (DC) via the major histocompatibility complex (MHC) I for CD8<sup>+</sup> TL and MHC II for CD4<sup>+</sup> TL. During ASCT however, chemotherapy and GVHD induce damage to the thymus making thymopoiesis inefficient, and thus immune reconstitution relies almost entirely on HP of TL.

The objective of this thesis was to understand how GVHD affects TL reconstitution. Using a mouse model, we demonstrate that CD4<sup>+</sup> TL fail to undergo HP when transferred in GVHD hosts due to low levels of IL-7 and reduced numbers of DCs. Moreover, the loss of DCs is mostly caused by reduced levels of Stromal Derived Factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) and the absence of DC progenitors in the bone marrow of mice suffering from GVHD. Treating GVHD hosts with SDF-1 $\alpha$  resulted in increased DC counts and, when administered in combination with IL-7, significantly improved HP of CD4<sup>+</sup> TL. Unlike CD4<sup>+</sup> TL, administration of IL-7 alone was sufficient to restore HP of CD8<sup>+</sup> TL in GVHD mice and this, regardless of the presence of DCs. These differences could be explained by two reasons: 1) MHC I expression is not limited to DCs but is expressed by stromal cells from the recipient, which is sufficient to promote HP in CD8<sup>+</sup> TL and 2) CD8<sup>+</sup> TL respond to lower doses of systemic IL-7 in comparison to CD4<sup>+</sup> TL.

In conclusion, these results can lead to future translational studies on the therapeutic potential of SDF-1 $\alpha$  and IL-7 in the immune reconstitution of grafted patients.

**Keywords:** GVHD, immune reconstitution, CD4<sup>+</sup> T lymphocyte, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte, dendritic cell, homeostatic proliferation, interleukin-7, SDF-1 $\alpha$ .

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	16
1. Homéostasie des lymphocytes T.....	17
1.1 Le système immunitaire.....	17
1.2 La thymopoïèse.....	17
1.3 Homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	19
1.3.1 La signalisation du TCR dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	20
1.3.2 L'interleukine-7 dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	21
1.3.3. Un rôle possible de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs ?.....	24
1.4 Lymphopénie et prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs.....	25
1.4.1 Prolifération homéostatique par le complexe peptide du soi-CMH et l'interleukine-7.....	26
1.4.2 Prolifération homéostatique par d'autres cytokines.....	27
1.4.3 Prolifération homéostatique par des antigènes commensaux.....	28
1.5 Homéostasie des lymphocytes T mémoires.....	29
1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> mémoires.....	29
1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> mémoires.....	30
2. Les cellules dendritiques.....	30
2.1. Les sous-types de cellules dendritiques.....	30

2.1.1. Les cellules dendritiques résidants dans les organes lymphoïdes.....	30
2.1.2. Les cellules dendritiques des organes non lymphoïdes .....	33
2.2. Fonctions des cellules dendritiques .....	36
2.2.1. Fonction des cellules dendritiques CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103 <sup>+</sup> .....	36
2.2.2. Fonction des cellules dendritiques CD11b <sup>+</sup> .....	37
2.2.3. Fonction des cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	38
2.3. Développement et homéostasie des cellules dendritiques .....	38
2.3.1. Facteurs de croissance impliqués dans le développement des cellules dendritiques .....	39
2.3.2. Différenciation directe des progéniteurs en situation d'inflammation .....	41
2.4. Les cellules dendritiques chez l'humain .....	41
3. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et maladie du greffon contre l'hôte	43
3.1. Les débuts de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques .....	43
3.2. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques pour traiter des cancers .....	44
3.2.1. Les différents types de transplantation de cellules souches.....	46
3.4. Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) .....	50
3.4.1. Modèles animaux .....	51
3.4.2. Pathophysiologie de la GVHD aiguë.....	53
3.4.3. Pathophysiologie de la GVHD chronique.....	58
3.5. GVL et contrôle de la GVHD .....	61
3.5.1. La réaction du greffon contre la leucémie (GVL) .....	61
3.5.2. Prophylaxie de la GVHD .....	61
3.5.3. Traitement de la GVHD.....	63
3.6. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et reconstitution immunitaire ..	65
3.6.1. Reconstitution du système inné et des lymphocytes B .....	65
3.6.2. Reconstitution des lymphocytes T .....	66
3.6.3. Traitements pour faciliter la reconstitution immunitaire .....	68
4. Hypothèse et objectifs.....	73
Chapitre 2: Article 1.....	74

SDF-1 $\alpha$ and IL-7 treatment improves homeostatic proliferation of naïve CD4 <sup>+</sup> T cells after allogeneic stem cell transplantation .....	74
ABSTRACT .....	76
INTRODUCTION .....	77
MATERIALS AND METHODS.....	79
RESULTS .....	83
DISCUSSION .....	89
ACKNOWLEDGMENTS .....	92
AUTHORSHIP .....	92
REFERENCES .....	94
FIGURE LEGENDS.....	101
Chapitre 3: Article 2.....	116
Non-hematopoietic MHC I antigen presenting cells are sufficient for CD8 regeneration mediated by IL-7 therapy during GVHD.....	116
ABSTRACT.....	118
INTRODUCTION .....	119
RESULTS AND DISCUSSION.....	120
CONCLUSION.....	124
MATERIALS AND METHODS.....	125
ACKNOWLEDGMENTS .....	127
AUTHORSHIP .....	128
REFERENCES .....	129
FIGURE LEGENDS.....	132
Chapitre 4: Discussion .....	137
4. Reconstitution immunitaire des lymphocytes T et des cellules dendritiques .....	138
4.1. Reconstitution des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> naïfs .....	138
4.2. Interleukine-7 et GVHD .....	140
4.3. Reconstitution des cellules dendritiques.....	141
4.3.1. Les cellules dendritiques du donneur sont éliminées par les lymphocytes T alloréactifs.....	142



4.3.2. L'absence des cellules dendritiques est due à un défaut de différenciation des progéniteurs au niveau de la MO.....	143
4.4. Dommages à la niche hématopoïétique durant la GVHD.....	145
4.5. Thérapies de reconstitution immunitaire après l'ASCT .....	148
4.5.1. Le SDF-1 $\alpha$ régénère les DC CD8 $\alpha^+$ dans les souris en GVHD .....	148
4.5.2. Le SDF-1 $\alpha$ , une chimiokine immunomodulatrice ?.....	150
4.5.3. Différence de reconstitution entre lymphocytes T naïfs CD4 $^+$ et CD8 $^+$ .....	153
4.6. Perspectives.....	157
4.6.1. L'importance de la reconstitution des lymphocytes T naïfs .....	157
4.6.2. L'impact de l'absence des cellules dendritiques.....	159
4.6.3. Les obstacles à la thérapie de reconstitution immunitaire .....	160
4.6.4. La prolifération homéostatique, une prolifération unique ?.....	160
Conclusion .....	163
Bibliographie.....	i
Annexes.....	xlix

## Liste des tableaux

Tableau I : Phénotype des cellules dendritiques des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes chez la souris .....	33
Tableau II : Résumé de la reconstitution post-greffe des principaux sous-types étudiés dans cette thèse. ....	69

## Liste des figures

Figure 1.1 : Différenciation des lymphocytes T au niveau du thymus. ....	18
Figure 1.2 : Voie de signalisation de l'IL-7R. ....	24
Figure 1.3: Régulation du développement et de l'homéostasie des cellules dendritiques chez la souris. ....	35
Figure 1.4: Courbe de survie après une greffe de moelle osseuse chez le chien. ....	45
Figure 1.5: Schéma simplifié de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. ....	49
Figure 1.6 : Étapes de la GVHD aiguë chez la souris. ....	56
Figure 1.7 : Étapes de la GVHD chronique chez la souris. ....	60
Figure 1.8 : Probabilité de rechute leucémique après une ASCT dépendamment du type de greffe et de GVHD. ....	62
Figure 1.9: Compte approximatif des cellules immunitaires (exprimé en % des comptes normaux) avant et après transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. ....	67
Figure 4.1 : Modèle de myélosuppression induite par la GVHD. ....	147
Figure 4.2: Résumé des actions potentielles du SDF-1 $\alpha$ ....	153
Figure 4.3 : Résumé des traitements permettant la restauration de la prolifération homéostatique des LTn CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> ....	156

## Liste des abréviations

ASCT	Transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques
AKT	Protéine kinase B
APC	Cellules présentatrices d'antigènes / antigen presenting cells
ARN	Acide ribonuléique
Batf3	Basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-X <sub>L</sub>	B-cell lymphoma – X long
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
CAR	Cellules CXCL12-abundant reticular
CCR	C-C chemokine receptor
CCL	C-C chemokine ligand
CD40L	CD40 ligand
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2
CDP	Progéniteur commun de DC / Common DC progenitors
Clec	Lectine de type C
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMP	Progéniteurs myéloïde commun
CEL	Cellules endothéliales lymphatiques
CFR	Cellules fibroblastiques réticulaires
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CTV	Cell trace violet
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DC	Cellules dendritiques / Dendritic cells
cDC	Cellules dendritiques conventionnelles

pDC	Celles dendritiques plasmacytoïdes
DLA	Dog leukocyte antigen
DLI	Infusion de lymphocytes du donneur / Donor lymphocyte infusion
DN	Double négatif
DP	Double positif
Eomes	Eomesodermin
ESAM	Endothelial cell-specific adhesion
ETP	Cellules progénitrices thymiques / Early Thymic Progenitors
FasL	Fas ligand
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
Flt3-L	Fms-like tyrosine kinase-3 ligand
FOXO1	Forkhead box protein O1
GDE	Gènes différenciellement exprimés
GLUT1	Glucose transporter 1
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GM-CSFR	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor
GVHD	Maladie du greffon contre l'hôte / Graft-versus-host disease
GVL	Greffon contre la leucémie / Graft-versus-leukemia
HDACi	Inhibiteur des histones déacétylases
HLA	Human leukocyte antigen
ICOS	Inducible costimulator
IFN $\gamma$	Interféron gamma
IL-	Interleukine
IL-7R	Récepteur de l'interleukine-7
IL-7R $\alpha$	Chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-7
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus kinase
KGF	Keratinocyte growth factor
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LT $\beta$	Lymphotoxine $\beta$

LTm	LT mémoire
LTn	Lymphocyte T naïf
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence-1
M-CSFR	Macrophage-colony stimulating factor receptor
MDP	Progéniteur de macrophage et DC
miHA	Antigène mineur d'histocompatibilité
MO	Moelle osseuse
MSC	Cellules stromales mésenchymales
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T cells
P27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PAMP	Molécule associée aux pathogènes / Pathogen-associated molecular patern
PBS	Phosphate buffer saline
PD-1	Program death-1
PDCA-1	Plasmacytoid dendritic cell antigen 1
PH	Prolifération homéostatique
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PK	Protéine kinase
PRR	Pathogen recognition receptor
psCMH	Complexe peptide du soi + CMH
Rag	Recombination-activating gene
rhGH	Hormone de croissance recombinante humaine
RTE	Émigrant thymique récents / Recent thymic emigrants
SCF	Stem cell factor
SCT	Transplantation de cellules souches hématopoïétiques
SDF-1 $\alpha$ /CXCL12	Stromal derived factor-1 alpha
Sirp $\alpha$	Signal regulatory protein- $\alpha$
STAT	Signal transducer and activator of transcription 5
TCR	Récepteur des cellules T / T-cell receptor

Th	Helper T cell
TLR	Toll like receptor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TREC	T-cell receptor excision circle
Treg	Lymphocyte T régulateur
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TSLPR	Thymic stromal lymphopoietin receptor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VIH	Virus d'immunodéficience humain
XCR1	X chemokine receptor 1
WT	Type sauvage / wild type

*À ma famille*



## Remerciements

J'aimerais en premier remercier mon directeur de recherche Martin Guimond. Martin, ce fût un plaisir de travailler à tes côtés. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et d'avoir tout mis en œuvre pour me permettre d'avoir de succès durant mes études. Je n'oublierai jamais mes débuts à « ouvrir » le laboratoire avec toi, nos réunions *happy hour* du vendredi et nos longues conversations dans ton bureau. Je te souhaite bonne chance dans la continuation des projets du laboratoire.

Je remercie également mes collègues du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, en particulier les membres du laboratoire du docteur Nathalie Labrecque avec qui j'ai passé la majorité de mes midis à discuter autant de sujets sérieux que de sujets plus farfelus les uns que les autres.

Je souhaite aussi remercier mes collègues de laboratoire pour leur soutien et leur contribution à une belle ambiance dans le laboratoire. Un merci particulier à Dominique Leboeuf pour son aide quotidienne et lors de mes longues journées d'expérience.

Je tiens aussi à remercier mes amis et ma famille pour leur soutien tout au long de mon doctorat. Leurs encouragements et leur bonne humeur ont alimenté mon énergie pour mener à bien mes études.

Finalement, tout ceci ne serait pas arrivé sans l'aide précieuse de trois personnes qui me sont chères. Maman, papa, je ne sais pas comment vous exprimer ma gratitude. C'est en partie grâce à vous que j'ai finalement pû réaliser mon rêve. Vous avez toujours été là pour moi et je sais que je pourrai toujours compter sur vous. Je suis très fier d'être votre fils et j'espère avoir une vie autant remplie de succès et de bonheur que la vôtre.

Et puis Émilie. Qui me connaît mieux que toi ? Tu as toujours été à mes côtés, à m'encourager, me soutenir et me consoler dans les moments difficiles. C'est une page de notre vie qui se tourne, et un nouveau chapitre qui débute, avec son lot de surprises et d'obstacles. Quoi qu'il en soit, te savoir à mes côtés me rassure et me permet d'avoir confiance en notre avenir.

Je remercie sincèrement tous les organismes subventionnaires qui m'ont soutenu financièrement durant mon doctorat: la Fondation Cole et le FRQS pour les bourses de doctorat; Immunologie Montréal, la Société Canadienne d'Immunologie et la bourse Michael Jeffrey Cherbaka pour les bourses de congrès.

# Chapitre 1 : Introduction

Le développement de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques a permis à la médecine de faire un bond de géant dans le domaine de l'hématologie. Malheureusement, les succès de cette technique sont restreints par la maladie du greffon contre l'hôte qui demeure la première cause de morbidité et de mortalité post-greffe. Bien que l'on puisse diminuer la gravité de la maladie du greffon contre l'hôte à l'aide d'immunosuppresseurs, cette réaction empêche la reconstitution normale du système immunitaire. Les patients deviennent donc très vulnérables aux infections opportunistes et aux rechutes.

L'objectif principal du travail contenu dans cette thèse était de comprendre comment la maladie du greffon contre l'hôte affecte la reconstitution du système immunitaire, principalement celle des lymphocytes T, en mettant l'accent sur la reconstitution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ce travail avait également comme deuxième objectif de déterminer les raisons pour lesquelles la thérapie à l'interleukine-7 agit préférentiellement sur la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans un contexte de maladie du greffon contre l'hôte. Finalement, nous avons également tenté d'établir la signature génique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en prolifération homéostatique.

La présente revue de la littérature a pour but d'illustrer l'état de nos connaissances sur l'homéostasie des lymphocytes T et des cellules dendritiques, ainsi que la maladie du greffon contre l'hôte. Nous mettrons l'accent sur la relation qui les lie lors de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

# 1. Homéostasie des lymphocytes T

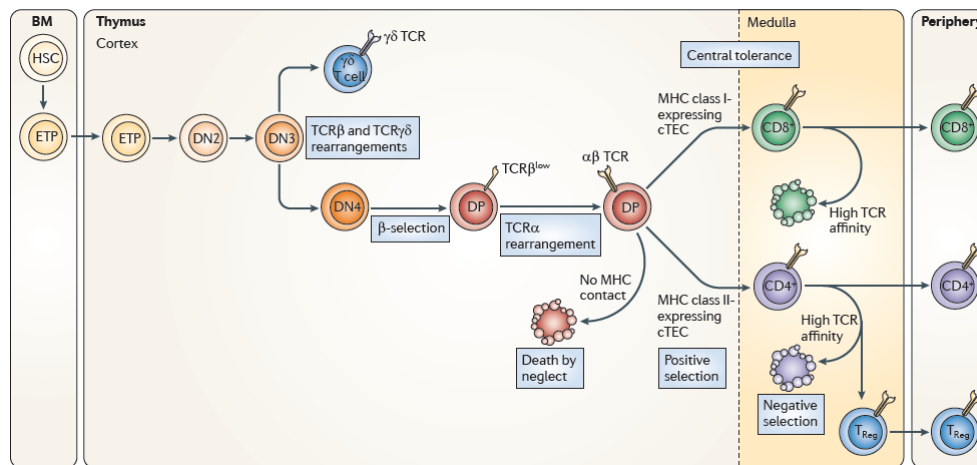
## 1.1 Le système immunitaire

Le système immunitaire est la clé de voûte des mécanismes de défense du corps humain. Il permet à l'organisme de se protéger rapidement et spécifiquement contre la multitude de microorganismes infectieux qui l'entourent. Le système immunitaire peut être divisé en deux branches distinctes : le système inné et le système adaptatif (Paul, 2008). Le système inné est composé de cellules pouvant reconnaître des motifs moléculaires retrouvés chez les agents infectieux. Le système adaptatif, quant à lui, est composé de cellules immunitaires qui possèdent la capacité de générer une mémoire immunologique suite à une réaction immunitaire. Les lymphocytes B et T sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes B sont responsables de la sécrétion d'anticorps tandis que les lymphocytes T (LT) sont impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, ce qui inclut l'orchestration de la réponse immunitaire et la réponse cytotoxique restreinte par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

## 1.2 La thymopoïèse

La génération de LT dans un contexte post-natal débute au moment où les cellules souches hématopoïétiques (CSH) migrent de la moelle osseuse vers le thymus (Miller, 2011) (Figure 1.1). Cet organe, situé au dessus du cœur et composé de deux lobes, est responsable du développement des LT. Les cellules progénitrices thymiques (*Early Thymic Progenitors*, ETP) une fois dans le thymus font partie de la population des cellules double négatives (DN) car elles n'expriment pas les corécepteurs CD4 et CD8. Les DN subissent une maturation thymique qui mène au réarrangement de la chaîne bêta du récepteur des cellules T (*T Cell Receptor*, TCR) qui survient au stade DN3. L'expression du pré-TCR entraîne la différenciation des DN en cellules doubles positives (DP) caractérisées par l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Ces DP doivent passer par deux processus de sélection afin de devenir matures et survivre. La sélection positive s'assure que les thymocytes générés peuvent reconnaître les molécules du complexe

majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. La sélection négative va, par la suite, éliminer les thymocytes qui possèdent un TCR qui reconnaît trop fortement les peptides du soi présentés par ces molécules du CMH (Starr et al., 2003). Ces deux étapes permettent d'obtenir un répertoire lymphocytaire diversifié qui pourra défendre l'individu en reconnaissant les antigènes étrangers.



**Figure 1.1 : Différenciation des lymphocytes T au niveau du thymus.** Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencient en cellules progénitrices thymiques (ETP) qui migrent vers le thymus et se différencient en LT immatures double négatifs CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) puis double positifs CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP). Ces lymphocytes vont devenir simple positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (SP) suite aux processus de sélections positive et négative. Tiré de Miller, 2011.

Une fois ces processus de sélection franchis, les LT matures se retrouvent en périphérie et survivent pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (Jameson, 2002; Sprent and Tough, 1994). Les LT se retrouvent principalement dans les ganglions lymphatiques et la rate. C'est dans ces organes lymphoïdes secondaires que les LT pourront s'activer contre des antigènes étrangers présentés par des cellules présentatrices d'antigènes. Chez la souris, ces LT matures sont considérés comme étant naïfs (CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>CCR7<sup>hi</sup>) puisqu'ils n'ont pas encore rencontré un antigène étranger. Ces cellules dépendent de deux signaux pour survivre: un signal provenant de cytokines, principalement l'IL-7, et un signal provenant de l'interaction entre le

TCR et le CMH + peptide du soi (psCMH) (Surh and Sprent, 2008; Takada and Jameson, 2009a). À la suite d'une réponse immunitaire, la majorité des LT naïfs (LTn) qui ont réagi à un antigène va mourir par apoptose. Une faible proportion de ces cellules survivra et se différenciera en LT mémoires (LTm). Encore aujourd'hui, les mécanismes qui mènent à la formation des LTm ne sont pas encore complètement élucidés et sont encore un sujet d'étude important (Mueller et al., 2013; Tanel et al., 2009). Les LTm peuvent être divisés en trois populations distinctes, les LTm centraux (LT<sub>CM</sub>: CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>CCR7<sup>hi</sup>CD103<sup>-</sup>), les LTm effecteurs (LT<sub>EM</sub>: CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>lo</sup>CD103<sup>-</sup>) et les LTm résidants (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>) (Mueller et al., 2013; Tanel et al., 2009). Les LT<sub>CM</sub> se situent surtout au niveau des ganglions lymphatiques, de la rate et de la moelle osseuse. Lors de la rencontre avec leur antigène, ils acquièrent des fonctions effectrices et prolifèrent rapidement. Les LT<sub>EM</sub> se situent plutôt dans les tissus périphériques et possèdent déjà des fonctions effectrices bien qu'ils ne puissent pas proliférer autant que les LT<sub>CM</sub>. Finalement, les LTm résidants se retrouvent principalement dans l'épithélium de différents organes comme la peau, l'intestin et le vagin.

### 1.3 Homéostasie des lymphocytes T naïfs

L'homéostasie est, de manière générale, un processus de régulation par lequel un organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur dans les limites des valeurs physiologiques en dépit des contraintes extérieures. Si l'on se penche sur l'homéostasie des LT, on peut la décrire comme étant le processus qui permet de maintenir leur nombre et leur diversité dans le corps humain. Une fois en périphérie, les LTn peuvent survivre plusieurs semaines, voire des mois, en demeurant au stade d'interphase (Sprent and Tough, 1994). Il est bien connu que l'homéostasie des LT est contrôlée principalement par une signalisation provenant du TCR ainsi que de l'IL-7R (Jameson, 2002; Sprent and Surh, 2011; Surh and Sprent, 2008; Takada and Jameson, 2009a). Nous résumerons dans la section qui suit les connaissances générales reliées à ce processus.

### 1.3.1 La signalisation du TCR dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs

L'importance de la signalisation par le TCR dans l'homéostasie des LTn fut mise en évidence lorsqu'on démontra que la survie des LTn CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> était diminuée quand on les privait du contact avec leur ligand psCMH en les transférant dans des souris déficientes en complexe majeur d'histocompatibilité (CMHI<sup>-/-</sup> et CMHII<sup>-/-</sup>) (Martin et al., 2006; Takada and Jameson, 2009b; Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997). L'utilisation de systèmes génétiquement modifiés et inductibles est venue confirmer cette idée en démontrant que l'abolition de l'expression du CMH, du TCR, ou de sa voie de signalisation proximale, entraîne une diminution significative de la survie des LTn CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Labrecque et al., 2001; Polic et al., 2001; Rooke et al., 1997; Witherden et al., 2000). Ainsi, la survie des LTn en périphérie dépend d'une signalisation par son TCR (Goldrath and Bevan, 1999).

Grâce aux études effectuées dans des souris transgéniques ne détenant qu'un seul complexe psCMH, il a été émis que la sélection dans le thymus de clones détenant un TCR capable de reconnaître les peptides du soi (sélection positive) permet, entre autres, aux LTn d'interagir continuellement avec ces mêmes peptides en périphérie et ainsi survivre (Ernst et al., 1999). Cette interaction à première vue semble dangereuse car elle pourrait entraîner une activation de clones ayant une forte réactivité contre le soi et le développement de maladies auto-immunes. Plus précisément, certaines de ces cellules de forte affinité pourraient être sensibles à la prolifération homéostatique induite par les cytokines chez un hôte lymphopénique, ce qui expliquerait la prédisposition aux développements de maladies auto-immunes par réaction croisée suite à une lymphopénie (Gagnon et al., 2010; King et al., 2004; Krupica et al., 2006). Toutefois, il a été démontré que les LT désensibilisent leur TCR avant d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires en périphérie (Grossman and Paul, 2001; Modiano et al., 2008; Wong et al., 2001). Cet ajustement diminuerait l'intensité du signal du TCR et serait important pour les LT ayant une affinité un peu trop forte pour les peptides du soi en les maintenant à un stade de quiescence et de tolérance. L'ajustement du TCR semble avoir lieu à la fin de la sélection positive et impliquerait la surexpression de molécules limitant la signalisation du TCR comme l'ubiquitine ligase Cbl-b, qui bloque l'activation de l'adaptateur Vav, la tyrosine phosphatase SHP-1, qui empêche l'activation de Lck, ainsi que CD5 (Bachmaier et al., 2000; Perez-Villar et al., 1999; Stephen et al., 2009; Tarakhovsky et al., 1995).

Des études suggèrent qu'il existe une certaine compétition entre les LT (compétition intraclonale) (Leitão et al., 2009; Moses et al., 2003; Troy and Shen, 2003). Plus précisément, des LT avec un TCR de même spécificité interagiraient avec les mêmes complexes psCMH tandis que des LT de spécificité différente interagiraient avec des complexes psCMH différents. De cette façon, l'abondance de psCMH et la compétition entre les LT de même spécificité contrôleraient la taille de la population lymphocytaire capable d'interagir avec ce ligand. L'importance de la compétition intraclonale a d'ailleurs été démontrée en observant que la survie lymphocytaire dans un receveur était inversement proportionnelle au nombre de cellules injectées au départ (Hataye et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, d'autres études permettent de croire qu'il existe une certaine hiérarchie dans la compétition entre les LT de même spécificité (Hao et al., 2006; Kieper et al., 2004; Singh et al., 2012). En effet, la diversité des ligands psCMH ainsi que la force avec laquelle pourrait interagir un TCR offrirait à certains LT un avantage clonal. La signalisation par le TCR est donc nécessaire à la survie des LTn et permettrait de maintenir un nombre optimal de LT de même spécificité pour assurer une diversité du répertoire.

### **1.3.2 L'interleukine-7 dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs**

L'importance de facteurs solubles dans le maintien de l'homéostasie des LTn a été démontrée par la capacité de certaines cytokines à promouvoir la survie de ces cellules lors de cultures *in vitro* (Rathmell et al., 2001; Vella et al., 1997). L'interleukine-7 (IL-7) est considérée comme la cytokine homéostatique principale et essentielle à la survie des LTn. En effet, l'absence de signalisation de l'IL-7, soit par le transfert de LT dans un hôte dépourvu d'IL-7 ou l'injection d'anticorps anti-IL-7, réduit le nombre et la survie des LTn (Schluns et al., 2000; Vivien et al., 2001). À l'inverse, la surexpression de l'IL-7 augmente le nombre de LTn (Mertsching et al., 1995).

Le gène de l'IL-7 humaine est situé sur le chromosome 8 (locus 8q12-q13) et code pour une protéine de 177 acides aminés et de poids moléculaire de 20kDa. Le gène de l'IL-7 murine est situé quant à lui sur le chromosome 3 (locus 3 A1; 36.6 cM) et code pour une protéine de 154 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 18 kDa (Jiang et al., 2005). La séquence



d'acides aminés de l'IL-7 humaine et murine ne présente que 55% d'homologie. Cependant, la majeure partie de cette différence est due à une insertion de 19 acides aminés près de la région C-terminale de l'IL-7 humaine qui ne semble pas essentielle pour son activité. En effet, la région N-terminale de la protéine, qui contient la séquence signal (prépeptide), est conservée à 92% entre l'humain et la souris.

L'IL-7 est produite à dose relativement constante, principalement par les cellules stromales et épithéliales de la moelle osseuse, du thymus et des organes lymphoïdes secondaires (Jiang et al., 2005). Elle joue un rôle clé dans le développement des lymphocytes B et T au niveau de la moelle osseuse et du thymus et est essentielle à la survie des LTn dans les ganglions lymphatiques. Les cellules fibroblastiques réticulaires (*Fibroblastic Reticular Cells*, FRC) situées dans la zone T, ainsi que les cellules endothéliales lymphatiques (*Endothelial Lymphoid Cells*, LEC), situées dans la médulla, semblent être les productrices principales d'IL-7 (Link et al., 2007; Miller et al., 2013). Les FRC interagissent étroitement avec les LT via la sécrétion de CCL19, CCL21 et CXCL12, qui suite à leur liaison avec leur récepteurs CCR7 et CXCR4, jouent un rôle crucial dans la migration des LT aux ganglions lymphatiques. Finalement, en plus de son rôle sur l'homéostasie des LT, la production d'IL-7 par les cellules stromales joue un rôle crucial dans le maintien de l'architecture et des fonctions des ganglions lymphatiques (Iolyeva et al., 2013; Onder et al., 2012).

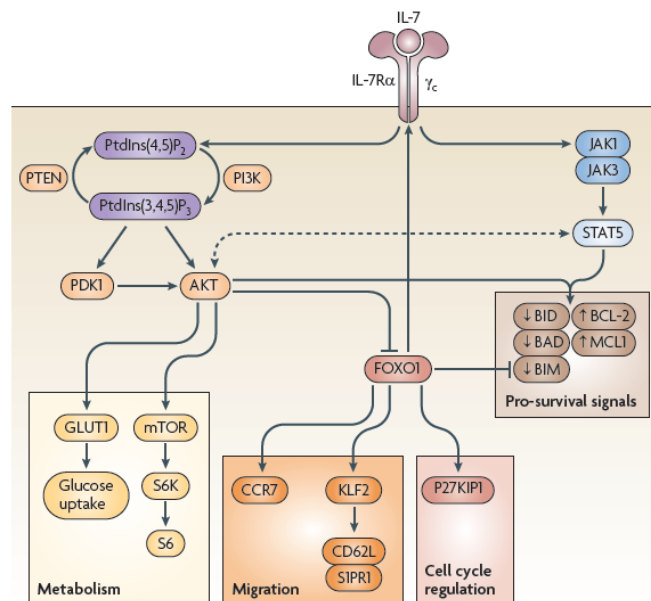
Le récepteur de l'IL-7 (IL-7R) est composé d'une chaîne alpha unique (IL-7R $\alpha$  ou CD127) et de la chaîne gamma du récepteur commun de cytokines ( $\gamma$ c ou CD132) qui est partagée par les récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Jiang et al., 2005). L'IL-7R $\alpha$  est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques, principalement celles de la lignée lymphoïde. Ceci inclut les précurseurs de cellules NK, DC, T et B mais également les LT et LB en développement et les LT matures. Cette protéine fait partie de la famille des récepteurs de cytokine de type 1 et est constituée de 439 acides aminés, avec un poids moléculaire de 49,5 KDa. Elle détient un domaine transmembranaire de 25 acides aminés et une queue cytoplasmique de 195 acides aminés qui contient trois tyrosines (Y401, Y449 et Y456) conservées entre l'humain et la souris. La chaîne  $\gamma$ c quant à elle ne peut pas lier l'IL-7. Cependant, elle permet d'augmenter l'affinité de la liaison entre l'IL-7 et l'IL-7R et est requise pour la signalisation et l'effet biologique de l'IL-7 (DiSanto et al., 1995; Lai et al., 1997; Noguchi et al., 1993; Ziegler et al., 1995).

La signalisation de l'IL-7 se fait principalement par la voie JAK3-STAT5 (Figure 1.2). En effet, la délétion de l'IL-7R $\alpha$ , de la chaîne  $\gamma$ c, de JAK3 ou de STAT5 entraîne des déficits sévères en LT (Yao et al., 2006). Le signal induit par la fixation de l'IL-7 se fait par l'activation des protéines Janus Kinase (JAK) 1 et 3 qui sont liées respectivement aux portions intracellulaires de l'IL-7R $\alpha$  et de la chaîne  $\gamma$ c (Surh and Sprent, 2008; Takada and Jameson, 2009a). L'IL-7 se lierait d'abord à l'IL-7R $\alpha$  qui recruterait par la suite la chaîne  $\gamma$ c, permettant l'interaction de JAK1 avec JAK3. JAK1 et JAK3 séparés ont une activité enzymatique intrinsèque faible, mais une fois phosphorylées mutuellement, ces deux kinases augmentent leur activité et phosphorylent la tyrosine 449 de l'IL-7R $\alpha$ , permettant ainsi le recrutement de la protéine *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5). Cette tyrosine est cruciale pour la signalisation de l'IL-7 puisque sa mutation empêche la phosphorylation de STAT5 (Lin et al., 1995). STAT5 se retrouve sous la forme de deux isoformes, STAT5A et STAT5B, qui sont identiques à 96% et peuvent former des homo ou hétérodimères. Une fois phosphorylé, le dimère STAT5 migre au noyau de la cellule pour réguler la transcription des gènes cibles, entre autres celle des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et MCL-1 (Amos et al., 1998; Opferman et al., 2003). Bcl-2 et MCL-1 peuvent à leur tour inhiber l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bid et Bim (Surh et Sprent, 2008).

En plus de la voie JAK-STAT5, l'IL-7 active la voie de signalisation de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) en phosphorylant sa sous-unité p85 via JAK3 (Dadi et al., 1994; Sharfe et al., 1995). Cette voie est essentielle à la survie et à la prolifération des LT (Pallard et al., 1999). La tyrosine 449 semble encore une fois nécessaire à l'activation de cette voie puisque sa mutation empêche l'activation de PI3K. Les médiateurs en aval de PI3K ne sont pas bien définis mais la signalisation de l'IL-7 entraîne via cette kinase l'activation d'AKT qui phosphoryle et inactive la protéine pro-apoptotique Bad (Datta et al., 2000; Li et al., 2004; Pallard et al., 1999). AKT phosphoryle également les protéines FOXO1 et p27, induisant leur dégradation et permettant de ce fait l'activation de Cdk2 et du cycle cellulaire (Barata et al., 2001; Fujita et al., 2002).

La signalisation de l'IL-7 via PI3K et AKT permet également le contrôle du métabolisme des LTn. En effet, la voie de signalisation de PI3K permet le recrutement de *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) et régule ainsi l'expression du transporteur de glucose GLUT1 (Barata et al., 2004; Wofford et al., 2008).

La signalisation de l'IL-7 entraîne également la diminution de l'expression de l'IL-7R $\alpha$  au niveau transcriptionnel. Il a été démontré que les LTn diminuaient l'expression du récepteur suite au contact avec l'IL-7 et réciproquement réexprimaient le récepteur en absence de la cytokine (Park et al., 2004). Ceci semble indiquer qu'il existerait une boucle de régulation négative permettant à un maximum de LTn de survivre avec une source aussi limitée et faible d'IL-7. D'ailleurs, l'expression continue d'un IL-7R $\alpha$  sur des LTn entraîne une diminution du nombre de LT, certainement en s'accaparant de tout l'IL-7 disponible.



**Figure 1.2 : Voie de signalisation de l'IL-7R.** La voie de signalisation principale se fait par l'entremise de JAK1 et 3 et de STAT5 et par PI3K. Tiré de Takada and Jameson, 2009a.

### 1.3.3. Un rôle possible de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs ?

La lymphopoïétine stromale thymique (*Thymic Stromal Lymphopoietin*, TSLP) a été découverte pour la première fois dans le surnageant d'une lignée de cellules stromales thymiques. Cette cytokine partage une structure et des fonctions similaires à l'IL-7 et utilise l'IL-7R $\alpha$  combiné à son récepteur, le TSLPR, pour activer sa voie de signalisation (Reche et al.,

2001; Ziegler and Liu, 2006). TSLP est exprimée par les cellules stromales, les cellules épithéliales, principalement celles des poumons, de l'intestin et de la peau, ainsi que par les basophiles (Liu et al., 2007; Rochman and Leonard, 2008). L'analyse des séquences de la TSLP humaine comparée à la murine démontre peu d'homologie entre ces deux protéines. Pourtant, toutes deux semblent exercer des effets biologiques similaires. Comme pour l'IL-7, TSLP peut entraîner la phosphorylation et l'activation de STAT5. Cependant, cet effet ne passe pas par l'activation de JAK1 et 3 mais passerait par l'activation de la kinase Tec (Isaksen et al., 1999; Ziegler and Liu, 2006). L'utilisation d'un modèle de souris TSLPR KO a démontré que TSLP pouvait contrôler directement l'homéostasie des LT CD4<sup>+</sup> en périphérie (Al-Shami et al., 2004). Il a été également démontré que TSLP pouvait signaler sur les LTn CD8<sup>+</sup> et accroître leur survie (Rochman and Leonard, 2008). Cependant, les souris TSLPR KO détiennent des nombres normaux de LT, démontrant ainsi le rôle non essentiel de TSLP sur l'homéostasie des LT (Carpino et al., 2004; Al-Shami et al., 2004).

## **1.4 Lymphopénie et prolifération homéostatique des lymphocytes**

### **T naïfs**

Dans un contexte normal, la prolifération des LT naïfs est très lente, voire inexistante. Cependant, suite à une déplétion sévère du réservoir de lymphocytes, les LT résiduels commencent à proliférer de façon beaucoup plus intense (Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). Ce phénomène, dans un contexte de lymphopénie, est appelé prolifération homéostatique (PH). La PH est engendrée par une augmentation de la disponibilité des deux mêmes signaux permettant la survie des LTn: l'interaction TCR-psCMH et la signalisation de l'IL-7 (Jameson, 2002; Surh and Sprent, 2008; Takada and Jameson, 2009a). Finalement, dans certains contextes bien précis, d'autres antigènes et cytokines peuvent induire l'expansion des LTn comme nous allons le voir ci-dessous.

### **1.4.1 Prolifération homéostatique par le complexe peptide du soi-CMH et l'interleukine-7**

Dans un contexte de lymphopénie, la disponibilité accrue des psCMH et les concentrations élevées d'IL-7 entraînent une prolifération spontanée des LTn. Cette prolifération homéostatique a pour but de restaurer le nombre de LTn à des niveaux normaux. Suite à la PH, les LTn acquièrent un phénotype de type mémoire (CD44<sup>hi</sup>) (Hamilton et al., 2006; Min et al., 2005). Ce phénotype pourrait résulter de la réponse des LTn à des antigènes étrangers (microorganismes de la flore intestinale par exemple) comme lors d'une réponse immunitaire. Cependant ces LT au phénotype mémoire sont aussi retrouvés dans un contexte où les souris lymphopéniques sont hébergées dans des conditions sans pathogènes (Huang et al., 2005; Vos et al., 1992). Il est maintenant reconnu que ce changement phénotypique est causé par la PH induite par les ligands psCMH (Ernst et al., 1999; Haluszczak et al., 2009; Viret et al., 1999). Toutefois, il est important de noter que la majorité des travaux étudiant le phénotype mémoire lors de la PH a été entreprise sur les LTn CD8<sup>+</sup>. En règle générale, les LTn CD4<sup>+</sup> sont beaucoup moins sensibles à la PH que les CD8<sup>+</sup> et l'étude du phénotype mémoire semble plus complexe (Ernst et al., 1999; Guimond et al., 2009; Moon et al., 2007). D'ailleurs, peu de LTn CD4<sup>+</sup> prolifèrent excessivement et la majorité conserve son phénotype naïf dans un contexte de PH (Min et al., 2005). De même, la prolifération suite à l'injection d'IL-7 dans une souris normale est beaucoup plus importante pour les LTn CD8<sup>+</sup> que CD4<sup>+</sup> (Boyman et al., 2008; Hennion-Tscheltzoff et al., 2013). Cette différence de prolifération homéostatique a été récemment étudiée par Guimond et ses collègues. Ces derniers ont démontré que, dans un contexte de lymphopénie, les niveaux élevés d'IL-7 étaient associés à une réduction de l'expression du CMH II à la surface de ces DC, entraînant ainsi la diminution de la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. Ainsi, l'abrogation de la signalisation de l'IL-7 dans les DC (souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ ) permet l'expression du CMH II et la restauration de la PH des CD4<sup>+</sup> (Guimond et al., 2009).

La propension des LTn à proliférer homéostatiquement dépend en partie de l'affinité de leur TCR pour le ligand psCMH (Kassiotis et al., 2003; Kieper et al., 2004). Des LT TCR transgéniques qui ont une forte affinité pour le psCMH (comme OT-I ou 2C) prolifèrent davantage que des LT de faible affinité (comme HY et OT-II) quand ils sont transférés dans un

hôte lymphopénique. En plus de la force d'interaction entre le TCR et le psCMH, l'abondance de psCMH à la surface des cellules présentatrices d'antigènes influencera également l'intensité de la prolifération (Ge et al., 2001).

Comme la signalisation du TCR est également nécessaire lors de l'activation des LT, on peut se demander comment celle-ci varie entre cette dernière et la prolifération homéostatique. Goldrath et al ont comparé la signature moléculaire de LT en prolifération homéostatique à celle de LT activés et ont découvert que ces processus partageaient la même voie de signalisation, à la différence que celle-ci était atténuée lors de la prolifération homéostatique (Goldrath et al., 2004). Ceci serait dû à la différence de présentation antigénique (Ag du soi vs Ag étranger), l'absence de co-stimulation lors de la prolifération homéostatique ainsi que la régulation de la signalisation du TCR (mentionné ci-dessus) qui seraient renversés lors de l'activation par la force de la combinaison des différents signaux d'activation. On peut penser entre autres à Foxo3a et Foxj1 qui empêchent l'activation de NFκB, mais également à l'autoinhibition de la calcineurine, empêchant l'activation de NFAT (Sprent and Surh, 2011; Surh and Sprent, 2000).

### **1.4.2 Prolifération homéostatique par d'autres cytokines**

Comme l'IL-7R partage la chaîne commune  $\gamma_c$  avec d'autres cytokines, on peut se demander si ces dernières peuvent également induire la PH. Il a été démontré que la PH des LTn peut être déclenchée par l'IL-2 ou l'IL-15, et ce même en absence de lymphopénie (Cho et al., 2007; Melchionda et al., 2005). Cependant, il n'y a aucun effet sur la PH des LTn CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans des souris lymphopéniques génétiquement déficientes en IL-2 ou IL-15. Par contre, les LTn CD8<sup>+</sup> polyclonaux ou transgéniques (Ovalbumin-specific transgenic TCR, OT-I) prolifèrent massivement lorsqu'on les transfère dans un hôte déficient soit pour l'IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  ou l'IL2-R $\gamma_c$ . Cette prolifération est presque équivalente à une réponse antigénique et ne s'applique qu'aux LTn CD8<sup>+</sup> qui acquièrent un phénotype mémoire (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi ou lo</sup>) (Cho et al., 2007; Ramsey et al., 2008). Par ailleurs, les souris déficientes en IL-2R $\alpha$  ou IL-2R $\beta$  développent un syndrome lymphoprolifératif accompagné d'une inflammation systémique et de maladies auto-immunes (Suzuki et al., 1995; Willerford et al., 1995). Parallèlement, la surexpression de l'IL-15 cause aussi un syndrome lymphoprolifératif, mais associé à une accumulation de cellules NK et des LT CD8<sup>+</sup> mémoires (Fehniger et al., 2001).

Très peu d'études ont démontré un rôle possible des autres cytokines de la famille des  $\gamma c$ , soit l'IL-4, l'IL-9 et l'IL-21 dans la PH des LTn. Il a été observé que l'IL-4 pouvait, comme l'IL-7, augmenter la survie des LTn *in vitro* et *in vivo* (Boursalian and Bottomly, 1999; Vella et al., 1997). Aussi, l'IL-4 semble pouvoir induire la prolifération des LTn CD8<sup>+</sup> *in vivo* (Morris et al., 2009). Cependant cette observation a été faite dans un contexte inflammatoire, où d'autres cytokines peuvent influencer la prolifération de ces cellules. L'IL-21 semble pouvoir augmenter la survie des LTn en activant la voie PI3K et induisant l'expression de Bcl-2. Cependant, cette cytokine n'est pas capable d'induire la prolifération des LTn *in vitro* et la PH des LTn IL-21R<sup>-/-</sup> est normale lorsqu'ils sont transférés dans une souris lymphopénique Rag<sup>-/-</sup> (Datta and Sarvetnick, 2008; Ostiguy et al., 2007). Finalement, l'IL-9 ne semble pas avoir d'effets sur la PH des LTn (Goswami and Kaplan, 2011).

### 1.4.3 Prolifération homéostatique par des antigènes commensaux

Bien que le psCMH et l'IL-7 en soient les acteurs principaux, il demeure que les antigènes étrangers de la flore microbienne sont aussi importants pour la PH. Le rôle de ces antigènes dans la PH pourrait varier en fonction de la gravité de la lymphopénie (Kieper et al., 2005; Min et al., 2005). La distinction semble être la plus importante entre les hôtes atteints de lymphopénie aiguë et les hôtes atteints de lymphopénie chronique. En effet, des études ont démontré que la PH dans des souris atteintes de lymphopénie aiguë (due à l'irradiation par exemple) est principalement déclenchée par le psCMH. À l'inverse, la PH dans des souris atteintes de lymphopénie chronique serait en bonne partie déclenchée par des antigènes étrangers comme ceux de la flore intestinale (Kieper et al., 2005). Cette prolifération est spécifique à l'antigène puisqu'elle n'a lieu que chez des LTn polyclonaux. Le transfert de LTn TCR transgéniques dans une souris Rag<sup>-/-</sup> conduit à une PH lente des LTn CD8<sup>+</sup> et quasiment aucune prolifération des LTn CD4<sup>+</sup>. Lors de l'injection de LTn polyclonaux dans une souris Rag<sup>-/-</sup>, une faible proportion de ces cellules va se mettre à proliférer rapidement, et ceci indépendamment de l'IL-7. Cette prolifération est d'ailleurs en partie responsable de la diminution de la diversité des TCR qui survient chez les greffés médullaires (Mackall et al., 1996). Finalement, le mécanisme par lequel les antigènes de la flore microbienne entraînent une

expansion homéostatique aussi robuste des LTn seulement dans un contexte de lymphopénie chronique n'est toujours pas compris.

## **1.5 Homéostasie des lymphocytes T mémoires**

Il a été démontré que la survie prolongée et le renouvellement intermittent des LTm ne nécessitent pas de contact avec le psCMH mais dépendent uniquement des cytokines IL-7 et IL-15. Nous décrivons brièvement les caractéristiques homéostatiques des LTm CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

### **1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires**

Contrairement aux LTn, il semble que l'interaction entre le TCR et le psCMH ne soit pas nécessaire à l'homéostasie des LTm CD8<sup>+</sup> (Murali-Krishna et al., 1999). La PH des LTm CD8<sup>+</sup> dépend principalement de l'IL-15 et de l'IL-7. Des LTm CD8<sup>+</sup> transférés dans une souris déficiente en IL-15 ne peuvent pas proliférer et meurent rapidement (Judge et al., 2002; Kennedy et al., 2000). À l'inverse, on observe un nombre plus important de LTm CD8<sup>+</sup> dans une souris IL-15 transgénique (Fehniger et al., 2001). D'ailleurs, L'IL-2R/15R $\beta$  est exprimé en plus forte quantité sur les LTm CD8<sup>+</sup> que sur les LTn CD8<sup>+</sup> et encore moins sur les LTm et LTn CD4<sup>+</sup> (Zhang et al., 1998). Des études ont démontré que l'expression de ce récepteur est régulée par deux facteurs de transcription, T-bet et Eomesodermin (Eomes), qui sont surexprimés lors de l'activation et la différenciation des LTn en LT effecteurs puis mémoires (Intlekofer et al., 2005). Conformément à cette découverte, l'inhibition de T-bet et Eomes est associée à un déficit sévère en LTm CD8<sup>+</sup>.

Étrangement, la génération des LTm CD8<sup>+</sup> chez la souris IL-15<sup>-/-</sup> est normale. Par contre, la survie de ces cellules est grandement diminuée (Becker et al., 2002). Dans un contexte de lymphopénie, les LTn CD8<sup>+</sup> qui adoptent un phénotype mémoire lors de la PH sont régulés par l'IL-7 et l'IL-15 (Tan et al., 2002). Finalement, l'IL-7 semble aussi jouer un rôle dans l'homéostasie des LTm CD8<sup>+</sup> puisque cette cytokine serait suffisante, et même nécessaire, pour leur survie (Kieper et al., 2002; Osborne et al., 2007; Schluns et al., 2000).



## 1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires

Comme avec les LTm CD8<sup>+</sup>, les LTm CD4<sup>+</sup> ne semblent pas requérir d'interaction avec le psCMH pour survivre et proliférer (Swain et al., 1999). L'homéostasie normale de ces cellules nécessite l'IL-7 et l'IL-15. L'IL-7 semble importante pour la survie et la prolifération des LTm CD4<sup>+</sup>, spécifiquement dans des conditions de lymphopénie (Lenz et al., 2004). L'IL-15 semble aussi permettre aux LTm CD4<sup>+</sup> de proliférer et survivre plus longtemps (Lenz et al., 2004; Purton et al., 2007). Ceci est surprenant considérant que les LTm CD4<sup>+</sup> expriment très peu le récepteur IL-2R $\beta$  comparé aux LTm CD8<sup>+</sup> (Zhang et al., 1998). Dans des conditions de lymphopénie cependant, l'IL-15 ne joue pas de rôle important dans l'homéostasie des LTm CD4<sup>+</sup> (Purton et al., 2007). Les LTm CD4<sup>+</sup> ressemblent donc aux LTm CD8<sup>+</sup> quant à leur besoin en IL-7 et IL-15 pour leur homéostasie. Malgré tout, la dépendance en IL-7 semble beaucoup plus importante pour les LTm CD4<sup>+</sup> alors que les LTm CD8<sup>+</sup> dépendent davantage de l'IL-15.

## 2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DC) jouent un rôle crucial au niveau du système immunitaire. Près de quarante ans après leur découverte, il est maintenant reconnu que ces cellules ont non seulement une incroyable capacité à engendrer une réponse immunitaire contre un pathogène, mais qu'elles influencent aussi l'homéostasie d'autres cellules du système immunitaire (Merad et al., 2013; Mildner and Jung, 2014; Satpathy et al., 2012).

### 2.1. Les sous-types de cellules dendritiques

#### 2.1.1. Les cellules dendritiques résidants dans les organes lymphoïdes

L'ensemble des DC, à part un sous-type dérivé des monocytes, se distingue par la co-expression constitutive des marqueurs CD45, CD11c, du CMH II et du récepteur Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3, CD135) (Tableau 1.1). Au niveau des organes lymphoïdes secondaires,

ces cellules sont divisées en deux groupes principaux, les DC conventionnelles (cDC) pouvant être divisées en DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) ou DC CD11b<sup>+</sup> (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>), et les DC plasmacytoïdes (pDC) (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>mPDCA<sup>+</sup>) (Facchetti et al., 2003; Vremec and Shortman, 1997; Vremec et al., 1992).

Les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> représentent 20 à 40% des DCs de la rate et des ganglions lymphatiques ainsi que la majorité des DC retrouvées dans le thymus. Comparé aux DC CD11b<sup>+</sup> et aux pDC, elles expriment davantage certains récepteurs, comme CD205 et Clec9A et expriment spécifiquement Xcr1 et CD36 (Dorner et al., 2009; Dudziak et al., 2007; Poulin et al., 2012; Ren et al., 1995). Au niveau moléculaire, quatre facteurs de transcription principaux semblent être importants pour leur développement: Batf3, IRF8, Nfil3 et Id2. En effet, la suppression de Batf3, Nfil3 et Id2 entraîne une diminution importante du nombre de DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> mais n'affecte pas les DC CD11b<sup>+</sup> ou les pDC tandis que l'absence d'IRF8 affecte autant les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> que les pDC (Aliberti et al., 2003; Hacker et al., 2003; Hildner et al., 2008; Kashiwada et al., 2011). Finalement, il a été récemment suggéré qu'IRF8 serait le régulateur principal de la différenciation en CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> puisque sa suppression seule empêche la génération de ce sous-type après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Seillet et al., 2013) (Figure 1.3).

Les DC CD11b<sup>+</sup> prédominent dans tous les organes lymphoïdes à l'exception du thymus. Comparé aux CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> leur population est plus hétérogène: elles peuvent être divisées en deux groupes, dépendamment de l'expression de la molécule *endothelial cell-specific adhesion* (ESAM) (Lewis et al., 2011) (Figure 1.3). Les DC CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>hi</sup> expriment plus fortement les marqueurs CD4, CD11c et le récepteur Flt3 et plus faiblement Csf-1R (M-CSFR), Csf-3R (GM-CSFR) et CCR2 comparé aux DC CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>lo</sup>, qui elles n'expriment pas Flt3. De manière importante, les DC CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>hi</sup> proviennent des progéniteurs communs de DC (CDP) tandis que les DC CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>lo</sup> semblent être dérivées des monocytes en condition d'inflammation (Domínguez and Ardavín, 2010; Ginhoux and Jung, 2014; Randolph et al., 1999). Les facteurs de transcription RelB, Notch2, RBP-J, IRF2 et IRF4 sont importants pour le développement et l'homéostasie des DC CD11b<sup>+</sup> (Caton et al., 2007; Ichikawa et al., 2004; Lewis et al., 2011; Suzuki et al., 2004; Wu et al., 1998). En effet, la suppression des facteurs de transcriptions IRF2, IRF4 et RelB entraîne une perte complète des DC CD11b<sup>+</sup>, tandis que la suppression de Notch2 n'affecte que le développement des DC CD11b<sup>+</sup>ESAM<sup>hi</sup>. Finalement,

on retrouve dans le thymus une petite population de DC CD11b<sup>+</sup> qui se distinguent des DC CD8α<sup>+</sup> par l'absence d'expression du CD8α et l'expression du *signal regulatory protein-a* (Sirpα ou CD172α) (Wu and Shortman, 2005).

Le troisième groupe principal de DC dans les organes lymphoïdes est les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Reizis et al., 2011) (Figure 1.3). Ces cellules représentent une faible proportion des DC, de 0,3 à 0,5% des cellules des organes lymphoïdes secondaires. Bien qu'elles partagent une origine commune avec les autres DC, ces cellules se différencient par leur morphologie sphérique et par une expression faible du CMH II et du marqueur CD11c et l'expression de B220, Siglec-H et Bst-2 (aussi connu sous le nom de PDCA-1 ou CD317) (Satpathy et al., 2012) (Tableau 1.1). Elles expriment un nombre plus restreint de récepteurs reconnaissant les pathogènes (*Pathogen Recognition Receptor*, PRR) comparé aux cDC, cependant elles expriment les TLR endosomaux 7 et 9 reconnaissant les ARN simple brin et l'ADN contenant des groupes CpG non méthylés (CpG), respectivement (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Au niveau moléculaire, les pDC expriment plus abondamment le facteur de transcription IRF7, ce qui leur permet de produire plus rapidement de l'IFN de type 1 (Crozat et al., 2010a; Honda et al., 2005). De plus, le facteur de transcription E2-2 joue un rôle crucial dans le développement et l'homéostasie de ces cellules. En effet, la suppression de ce facteur dans les progéniteurs hématopoïétiques entraîne l'absence de génération de pDC et sa suppression dans les pDC matures cause une redifférenciation de ces dernières en pseudo DC CD8α<sup>+</sup> (Cisse et al., 2008; Ghosh et al., 2010).

**Tableau I : Phénotype des cellules dendritiques des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes chez la souris.** Tiré de Merad et al., 2013.

Phenotypical marker	pDC	Lymphoid tissue cDC		Nonlymphoid tissue cDC			Langerhans cell
		CD8 <sup>+</sup> cDC	CD11b <sup>+</sup> cDC	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> cDC	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> intestinal cDC	CD103 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> cDC	
CD45	+	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+++	+++	++	++	++	++
MHC class II	+	++	++	++	++	++	++
CD8	subset	+	-	-	-	-	-
CD4	+	-	+/-	-	-	-	ND
CD11b	-	-	+	-	+	+	+
CD103	-	subset	-	++	++	-	-
Langerin	-	subset	-	+	-	-	++
EpCAM	-	-	-	-	-	-	++
B220	+	-	-	-	-	-	-
CD24	ND	++	+	++	++	+/-	++
Btla	+	++	+	++	+	+/-	ND
c-kit	-	+	+	+	+	+/-	ND
CD26	+	+	+	+	+	+/-	ND
Xcr1	-	+	-	+	-	-	-
CD36	-	+	-	+	ND	-	-
Cystatin C	+	++	+	ND	ND	ND	ND
Clec9a (DNDR1)	+	++	-	++	-	-	-
Cadm1 (Nect2)	-	+	-	ND	ND	ND	ND
CD205	-	++	+	++	ND	ND	++
CX <sub>3</sub> CR1	-	subset	-	-	-	++	+
CD209 (dc-sign)	++	-	+	-	+	+/-	-
F4/80	-	-	+	-	-	+	+
CD172a (Sirpα)	+	-	++	-	-	++	+
CD64 (Fcγr1)	-	-	-	-	-	++	ND
Ly6C	++	-	-	-	-	+/-	-

ND : non déterminé

### 2.1.2. Les cellules dendritiques des organes non lymphoïdes

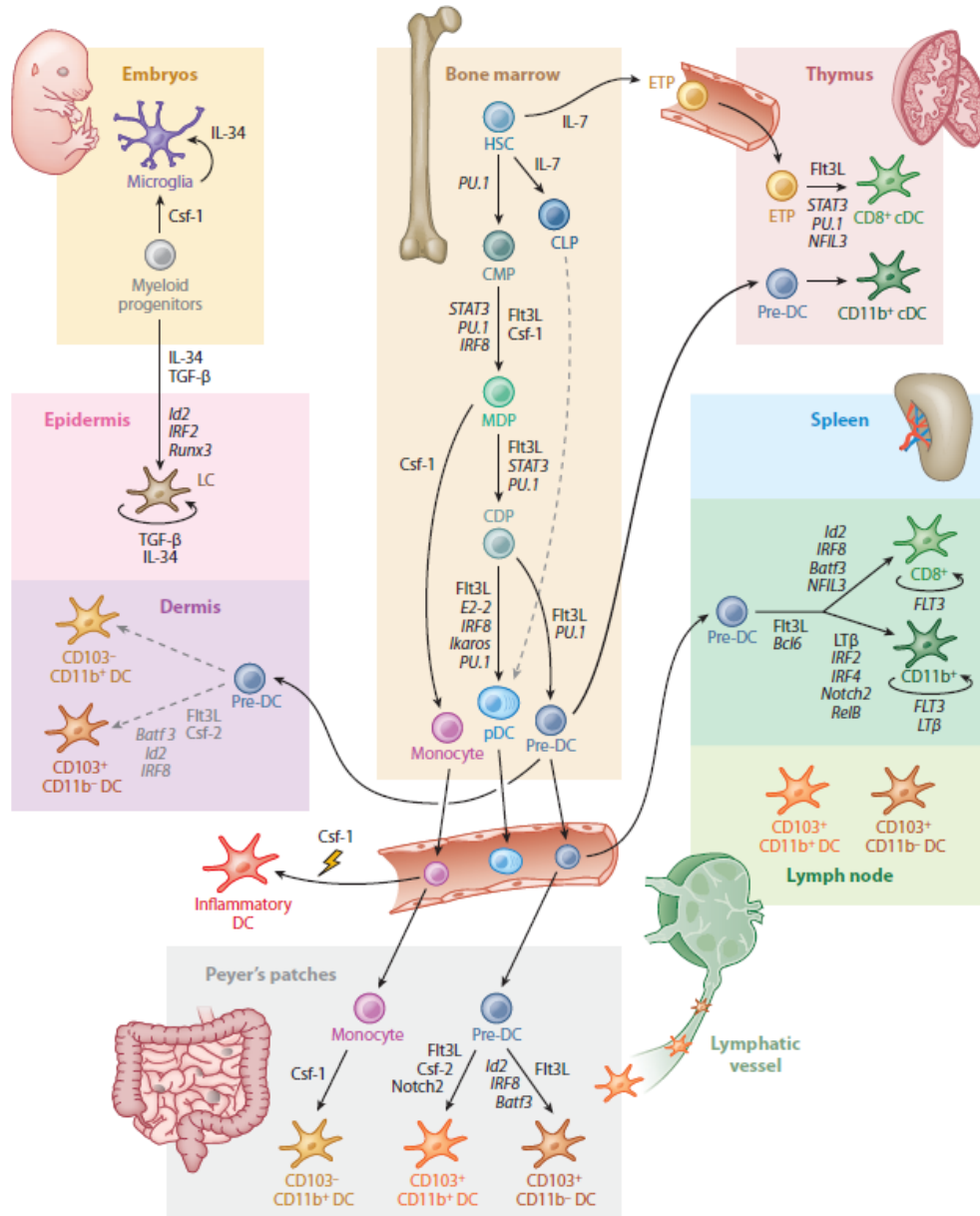
Les cDC des organes non lymphoïdes représentent de 1 à 5 % des cellules retrouvées dans ces tissus et peuvent être divisés en deux groupes : les DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> et les DC CD11b<sup>+</sup> (Merad et al., 2013).

Les DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> peuvent être définies comme l'équivalent des DC CD8α<sup>+</sup> dans les tissus non-lymphoïdes. Bien qu'elles n'expriment pas forcément le CD8α, les DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> partagent avec les DC CD8α<sup>+</sup> le même phénotype et la même expression génique (Edelson et al., 2010; Ginhoux et al., 2009) (Tableau I et Figure 1.3). Entre autres, elles expriment le récepteur XCR1, les mêmes TLR, elles sont efficaces à faire de la présentation croisée aux LT CD8<sup>+</sup> et produisent de l'IL-12 (Bedoui et al., 2009; Sousa et al., 1997).

L'autre groupe de DC retrouvé dans les tissus non lymphoïdes est composé des DC CD11b<sup>+</sup>. Ces DC n'expriment pas le CD103, à part certaines situées dans la lamina propria.

Il existe dans l'épiderme un type de cellules que l'on appelle cellules de Langerhans. Ces cellules représentent 3 à 5 % des cellules de l'épiderme et se distinguent des autres DC par leur ontogénie et homéostasie distinctes (Ginhoux and Merad, 2010). On les distingue phénotypiquement des autres DC de la peau par l'expression forte de CD207 (langérine) ainsi que des niveaux plus faibles de CMH II et CD11c.

Finalement on retrouve dans les ganglions lymphatiques périphériques un type de DC appelé DC migratoires (Randolph et al., 2005). Ces DC, contrairement aux DC résidentes proviennent du tissu environnant et migrent aux ganglions par les vaisseaux lymphatiques où elles meurent. À l'état basal, les DC migratoires expriment des niveaux plus élevés de CMH II et des niveaux plus faibles de CD11c que les DC résidentes. Il devient cependant difficile de les distinguer dans un contexte d'inflammation.



**Figure 1.3: Régulation du développement et de l'homéostasie des cellules dendritiques chez la souris.** Les lignes pointillées représentent des voies suspectées mais pas encore confirmées. On retrouve les principaux facteurs de transcriptions et cytokines impliqués dans le développement et l'homéostasie des progéniteurs de DC et des DC matures (HSC : cellules souches hématopoïétiques; CMP : progéniteur commun myéloïde; CLP : progéniteur commun lymphoïde; MDP : progéniteur de macrophage et DC; CDP : progéniteur commun des DC; ETP : cellule progénitrice thymique; LC : cellules de Langerhans). Tiré de Merad et al., 2013.

## 2.2. Fonctions des cellules dendritiques

De manière générale, les DC sont reconnues comme ayant le potentiel de reconnaître, capturer, apprêter et présenter des antigènes aux LT (Banchereau and Steinman, 1998). Elles détiennent une forte activité phagocytaire lorsqu'elles sont immatures, et sont capables de produire des cytokines une fois matures. Leur rôle principal est de réguler la réponse lymphocytaire T que ce soit à l'état basal (tolérance au soi, homéostasie) ou durant une infection (réponse immunitaire).

### 2.2.1. Fonction des cellules dendritiques CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>

Les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> sont situées au niveau de la zone marginale dans la rate, de façon à filtrer les antigènes dans le sang, et au niveau des sinus sous-capsulaires dans les LN, pour filtrer les antigènes provenant des tissus par les vaisseaux lymphatiques afférents ou capturer les Ag des DC migratoires (Heath and Carbone, 2009; Henri et al., 2001; Idoyaga et al., 2009). Suite à leur activation et à la capture d'un Ag, les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ainsi que les DC migratoires migrent vers la zone riche en LT (zone T) des organes lymphoïdes secondaires, pour présenter celui-ci aux LTn et les activer.

Les CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> expriment différents PRR que les autres sous-types de DC. Entres autres, elles sont les seules à exprimer le TLR3, qui reconnaît l'ARN viral double brin, et le TLR11, qui reconnaît la protéine *Toxoplasma gondii* (Edwards et al., 2003; Yarovinsky et al., 2005). Aussi, ces sous-types expriment fortement le CD36 et la lectine de type C Clec9A, qui reconnaissent respectivement des cellules en apoptose et nécrosées (Ren et al., 1995; Sancho et al., 2009), permettant la présentation d'antigènes exogènes dérivés de tumeur ou virus (Iyoda et al., 2002). Finalement, les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> sont les seules cellules à exprimer le récepteur de chimiokine XCR1, celui-ci jouant un rôle dans l'activation des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Dorner et al., 2009).

Comparées aux autres sous-types de DC, les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> ont une capacité supérieure à présenter des antigènes aux LT CD8<sup>+</sup> et les activer (Haan et al., 2000; Hildner et al., 2008). En effet, des souris Batf3 déficientes, qui ne peuvent produire ces DC, sont incapables de monter

une réponse cytotoxique efficace contre un virus démontrant le rôle clé de ce sous-type dans la réponse cytotoxique. À l'inverse, ces cellules ne semblent pas réguler l'activation des LT CD4<sup>+</sup> puisque ceux-ci peuvent engendrer une réponse contre une tumeur ou un virus dans les souris Batf3 déficientes (Hildner et al., 2008). Les DC CD8α<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> sont également les principales productrices d'IL-12, cytokine jouant un rôle clé dans la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> en LT cytotoxiques (Mashayekhi et al., 2011; Sousa et al., 1997). De plus, ces cellules ont également un potentiel accru à faire de la présentation croisée, dû à une voie de présentation endocytaire à faible potentiel de dégradation ainsi qu'un transport du phagosome vers le cytosol, permettant le transfert d'antigènes exogènes sur les molécules de CMH I (Delamarre et al., 2005; Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001). Finalement, si elles ne sont pas activées, les CD8α<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> participent à la tolérance périphérique en induisant l'apoptose des LT autoréactifs et en induisant la génération de LT régulateurs (Tregs) (Liu et al., 2002; Qiu et al., 2009; Yamazaki et al., 2008).

Au niveau du thymus, les DC CD8α<sup>+</sup> composent la majorité de la population de DC retrouvée dans cet organe. Elles peuvent être divisées en deux groupes, les CD8α<sup>+</sup> intrathymiques, qui semblent être dérivées directement de progéniteurs lymphoïdes dans le thymus, et un second groupe provenant de la périphérie (Ardavin et al., 1993; Wu and Shortman, 2005). Elles semblent être impliquées dans la tolérance centrale via la sélection négative des thymocytes bien que ce rôle soit principalement rempli par les cellules épithéliales thymiques de la médulla (Klein et al., 2009; Yano et al., 2008). De plus, certaines études suggèrent qu'elles joueraient un rôle dans le développement des Treg, bien que ceci reste sujet à controverse (Hsieh et al., 2012; Klein et al., 2009).

### **2.2.2. Fonction des cellules dendritiques CD11b<sup>+</sup>**

Nos connaissances sur les fonctions précises des DC CD11b<sup>+</sup> sont moins poussées que celles sur les CD8α<sup>+</sup>. Ceci est dû principalement au manque de modèle permettant une élimination spécifique de ces cellules. Comme les autres sous-types de cDC, les DC CD11b<sup>+</sup> peuvent reconnaître des antigènes, les apprêter et les présenter aux LT dans les ganglions lymphatiques (Dudziak et al., 2007). Contrairement aux DC CD8α<sup>+</sup>, elles ne sont pas efficaces à faire de la présentation croisée et ne produisent pas d'IL12. Cependant, ces cellules sont



reconnues comme étant plus efficaces à présenter des antigènes via le CMH II et donc à activer les LT CD4<sup>+</sup> (Dudziak et al., 2007; Lewis et al., 2011).

Finalement, on retrouve une faible proportion de DC CD11b<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup> dans le thymus (Wu and Shortman, 2005). Cette population qui provient de la périphérie peut aussi induire la sélection négative des thymocytes autoréactifs et la différenciation des thymocytes en Tregs (Bonasio et al., 2006; Proietto et al., 2008).

### **2.2.3. Fonction des cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les pDC sont quant à elles spécialisées dans la réponse antivirale lors de laquelle elles peuvent sécréter des quantités importantes d'interféron de type 1 (Colonna et al., 2004; Reizis et al., 2011). Cependant, leur absence n'altère pas la charge virale ou l'activation des LT, suggérant qu'elles n'ont pas un rôle majeur dans la présentation antigénique (Swiecki et al., 2011). Par contre, il a été démontré qu'elles jouent un rôle clé dans le contrôle de la réponse virale chronique, en soutenant la survie des LT CD8 cytotoxiques grâce à leur sécrétion d'interféron (Cervantes-Barragan et al., 2012).

## **2.3. Développement et homéostasie des cellules dendritiques**

Plusieurs études ont démontré que les cDC ont une demi-vie courte et sont constamment remplacées à partir des progéniteurs hématopoïétiques (Liu and Nussenzweig, 2010; Merad et al., 2013). Un progéniteur ne se différenciant qu'en DC a d'ailleurs été caractérisé (Liu et al., 2009; Naik et al., 2007; Onai et al., 2007). Ces progéniteurs communs de DC (*Common DC Progenitors*, CDP) (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>IL-7Rα<sup>-</sup>CD16/32<sup>low</sup>c-kit<sup>int</sup>CD11b<sup>-</sup>CD115<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>) sont produits dans la moelle osseuse à partir des progéniteurs de macrophage et DC (*Macrophage and DC Progenitors*, MDP), eux-mêmes provenant des progéniteurs communs lymphoïdes (*Common Lymphoid Progenitors*, CLP) ou de progéniteurs communs myéloïdes (*Common Myeloid Progenitors*, CMP). En effet, le transfert de ces progéniteurs (MDP, CLP ou CMP) dans des

souris irradiées permet le développement, mais pas uniquement, de DC (Fogg et al., 2006; Manz et al., 2001; Traver et al., 2000).

Les CDP se différencient par la suite en pré-cDC (CD11c<sup>+</sup>CMHII<sup>-</sup>) qui migrent vers les organes lymphoïdes pour finir leur développement en cDC CD8α<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup>, mais pas en pDC (Liu et al., 2009; Naik et al., 2007). En effet, à la différence des cDC, les pDC finissent leur maturation dans la moelle osseuse avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (Cisse et al., 2008; Schlitzer et al., 2011).

### **2.3.1. Facteurs de croissance impliqués dans le développement des cellules dendritiques**

Le développement des DC est fortement dépendant de l'expression du récepteur Flt3 (CD135) à la surface des progéniteurs hématopoïétiques mais également de leur potentiel à répondre au ligand du Flt3, le Flt3-Ligand (Flt3-L). En effet, on retrouve très peu de DC dans des souris Flt3<sup>-/-</sup> ou Flt3-L<sup>-/-</sup> (Karsunky et al., 2003; McKenna et al., 2000; Waskow et al., 2008). À l'inverse, l'expression forcée de Flt3 dans des progéniteurs Flt3<sup>-/-</sup> restaure leur capacité à se différencier en DC et l'injection ou la surexpression du Flt3-L entraîne une augmentation importante de cDC et pDC *in vivo* (Manfra et al., 2003; Maraskovsky et al., 1996; Onai et al., 2006).

Le Flt3-L est produit par les cellules stromales, les cellules endothéliales et les LT activés (Wodnar-Filipowicz, 2003). Le récepteur Flt3 est quant à lui exprimé à la surface des CSH, des CLP et une partie des CMP, des MDP, des CDP et finalement des pré-cDC. Son expression est d'ailleurs perdue dans les autres lignées qui ne se différencient pas en DC. En périphérie, seuls les pré-DCs, les cDC et les pDC expriment Flt3 (Karsunky et al., 2003). Il semble qu'environ 5% des cDCs, ou leurs progéniteurs immédiats, prolifèrent en périphérie, et le Flt3-L et la LTβ jouent un rôle important dans l'homéostasie de ces cellules (Kabashima et al., 2005; Liu and Nussenzweig, 2010; Waskow et al., 2008). Cependant ces cellules ne s'auto-renouvellent pas et sont constamment remplacées par de nouvelles cellules provenant des progéniteurs.

Le GM-CSF est couramment utilisé pour différencier des progéniteurs hématopoïétiques en DC *in vitro* (Caux et al., 1996; Inaba et al., 1992; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Son récepteur est d'ailleurs exprimé à la surface des MDP et des CDP. Cependant, l'absence de ce facteur de croissance, ou de son récepteur, semble surtout affecter le développement des DC des organes non-lymphoïdes et son injection *in vivo* n'augmente pas le nombre de DC des organes lymphoïdes (Greter et al., 2012; King et al., 2010; Kingston et al., 2009; Maraskovsky et al., 1996; Vremec et al., 1997). *In vitro*, le GM-CSF permet la différenciation des monocytes en DC (Palucka et al., 1998; Santin et al., 1999).

Comme mentionné plus tôt, la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ ) semble également jouer un rôle sur l'homéostasie des DC, principalement sur les DC CD11b<sup>+</sup> puisque les souris déficientes pour son récepteur (LT $\beta$ R) ont des nombres absolus plus faibles de ce sous-type dans les organes lymphoïdes secondaires (Kabashima et al., 2005; Wang et al., 2005; Wu et al., 1999). À l'inverse la surexpression de LT $\beta$  augmente la quantité de DC CD11b<sup>+</sup>.

Le *Stromal-Derived Factor 1 alpha* (SDF-1 $\alpha$  ou CXCL12), est une chimiokine exprimée par plusieurs types cellulaires dont les cellules stromales, les *CXCL12-abundant reticular cells* (CAR cells), les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les cellules exprimant la nestine, retrouvées dans la moelle osseuse (Nagasawa, 2014). Cette chimiokine, aussi connue sous le nom de *pre-B cell-growth-stimulating factor* a été caractérisée à sa découverte comme un facteur nécessaire à la croissance des progéniteurs de lymphocytes B (Nagasawa et al., 1996). Il a été par la suite démontré que cette chimiokine et son récepteur, CXCR4, n'ont pas juste un effet sur la migration et l'activation des leucocytes mais jouent des rôles cruciaux dans des processus développementaux comme l'hématopoïèse, la cardiogénèse, la formation vasculaire et la neurogénèse. Au niveau hématopoïétique, l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour exprimer de façon conditionnelle, ou ne pas exprimer du tout, CXCL12 ou CXCR4, a démontré le rôle essentiel de cette voie de signalisation dans la colonisation de la moelle osseuse par les CSH durant l'ontogénie mais aussi dans la maintenance des CSH dans la moelle osseuse chez l'adulte (Ara et al., 2003; Greenbaum et al., 2013; Sugiyama et al., 2006). Au niveau immunitaire, cet axe est nécessaire pour le développement des lymphocytes B, des cellules NK et des DC dans la moelle osseuse (Kohara et al., 2007; Noda et al., 2011; Tokoyoda et al., 2004). Finalement, SDF-1 $\alpha$  joue également un rôle sur l'homéostasie des DC puisqu'il a été démontré

qu'il affecte la maturation et la survie de ces cellules (Delgado-Martin et al., 2011; Hernández-López et al., 2008; Kabashima et al., 2007; Wang et al., 2009).

### **2.3.2. Différenciation directe des progéniteurs en situation d'inflammation**

Il a été récemment démontré que les progéniteurs hématopoïétiques expriment des TLR et que suite à la reconnaissance de PAMP, ceux-ci peuvent se différencier en DC *in vitro* et *in vivo* (Nagai et al., 2006; Sioud and Fløisand, 2007; Sioud et al., 2006; Welner et al., 2008; Yáñez et al., 2013). En ce qui concerne les CDP, il a été démontré que ces progéniteurs, suite à l'injection de LPS, diminuent l'expression du récepteur CXCR4 et surexpriment le récepteur CCR7, leur permettant de quitter la moelle osseuse et de migrer aux ganglions lymphatiques où ils se différencient en DC (Schmid et al., 2011).

## **2.4. Les cellules dendritiques chez l'humain**

Chez l'humain, les DC sont caractérisées par l'absence de marqueurs de lignée ( $\text{Lin}^-$ : CD3, CD19, CD14, CD20 et glycophorine A) et l'expression constitutive du CMH II. Même si les monocytes et macrophages humains expriment le CD11c, on définit les cDC comme étant  $\text{Lin}^- \text{MHCII}^+ \text{CD11c}^+$  (Durand and Segura, 2015; Merad et al., 2013).

On retrouve deux types de DC dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques: les pDC et les cDC, ces dernières pouvant être divisées en deux sous-types, un exprimant le CD1c (BDCA1) et l'autre exprimant le CD141 (BDCA3) (Dzionek et al., 2000; Jongbloed et al., 2010; MacDonald et al., 2002; McIlroy et al., 2001).

Les DC  $\text{CD1c}^+$  représentent la majorité des cDC dans le sang et semblent être plus reliées aux DC murines  $\text{CD11b}^+$  (Robbins et al., 2008). Les DC  $\text{CD141}^+$  constituent quant à elles une minorité de cDC dans le sang. Une étude transcriptomique a démontré que, malgré l'absence d'expression du  $\text{CD8}\alpha$ , ces cellules sont l'équivalent des DC  $\text{CD8}\alpha^+$  observées chez la souris (Robbins et al., 2008; Villadangos and Shortman, 2010). Comme pour les  $\text{CD8}\alpha^+$ , les DC  $\text{CD141}^+$  sont les seules cDC à exprimer Clec9A et XCR1 et expriment les mêmes facteurs de

transcription, c'est-à-dire Batf3 et IRF8 (Crozat et al., 2010b; Huysamen et al., 2008; Robbins et al., 2008; Segura et al., 2012). D'ailleurs, l'inhibition de Batf3 dans les progéniteurs hématopoïétiques empêche leur différenciation Flt3-L dépendante en CD141<sup>+</sup> mais pas en CD1c<sup>+</sup> (Poulin et al., 2012). Finalement, les CD141<sup>+</sup> partagent les mêmes fonctions que les DC CD8α<sup>+</sup> murines : elles peuvent produire de grande quantité d'IL-12, reconnaître et phagocyter des cellules mortes et présenter des antigènes par présentation croisée (Crozat et al., 2010b; Jongbloed et al., 2010; McIlroy et al., 2001; Poulin et al., 2012). La relation entre les cDC humaines et murines n'est cependant pas complètement semblable. En effet, les CD1c<sup>+</sup> sont également capables de produire de l'IL-12 et d'activer les LT CD8<sup>+</sup> et contrairement à la souris, une mutation d'IRF8 chez l'humain n'entraîne pas la perte spécifique des DC CD141<sup>+</sup> (Hambleton et al., 2011; Nizzoli et al., 2013).

Tout comme les pDC murines, les pDC humaines sont caractérisées par une production massive d'IFN de type 1. Elles sont définies comme étant Lin<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup>CD303(BDCA2)<sup>+</sup>CD304(BDCA4)<sup>+</sup> (Reizis et al., 2011). Notons que, contrairement aux pDC murines, les pDC humaines n'expriment pas le CD11c (Durand and Segura, 2015; Reizis et al., 2011). Cependant, leur développement requiert lui aussi l'expression du facteur de transcription E2-2 (Cisse et al., 2008; Ghosh et al., 2010).

### **3. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et maladie du greffon contre l'hôte**

#### **3.1. Les débuts de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques**

C'est avec la fin de la Deuxième Guerre mondiale et l'explosion des bombes atomiques que débuta l'histoire de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Ezzone, 2009; Little and Storb, 2002; Thomas, 1999; Thomas and Blume, 1999). La peur de cette nouvelle arme nucléaire incita un grand nombre de chercheurs à s'intéresser aux effets biologiques de l'irradiation. En 1949, Jacobson et ses collègues découvrirent qu'une souris irradiée de manière létale pouvait survivre si l'on protégeait sa rate à l'aide de plomb au moment de l'irradiation (Jacobson and Marks, 1949). Peu de temps après, Lorenz et ses collègues démontrèrent qu'un effet protecteur contre l'irradiation pouvait être apporté en injectant une solution à base de cellules de rate ou de moelle osseuse (Lorenz et al., 1951). Au départ, les chercheurs croyaient que cette protection était due à un facteur « humoral » plutôt que cellulaire mais les travaux de Barnes et Loutit en 1954 ainsi que ceux de Main et Prehn en 1955 confirmèrent que la source protectrice provenait bel et bien des cellules de moelle osseuse injectées (Barnes and Loutit, 1953; Main and Prehn, 1955).

Ce sont les modèles animaux qui permirent le développement de nos connaissances dans le domaine de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Des études chez la souris démontrèrent que l'injection de cellules de moelle osseuse par voie intraveineuse se révélait la meilleure façon de régénérer un système hématopoïétique (van Bekkum et al., 1967). On démontra également que l'injection de cellules de moelle osseuse allogénique (c.-à-d. d'un hôte différent mais de la même espèce) pouvait rendre le receveur malade. Cette maladie fut décrite comme étant une réaction immunitaire des cellules lymphoïdes injectées contre les cellules de l'hôte et est maintenant connue sous le nom de : maladie du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease*, GVHD) (Billingham and Brent, 1957). Par la suite, débuta l'emploi de substances pouvant réduire les signes cliniques de la GVHD, comme le méthotrexate (Uphoff, 1958).

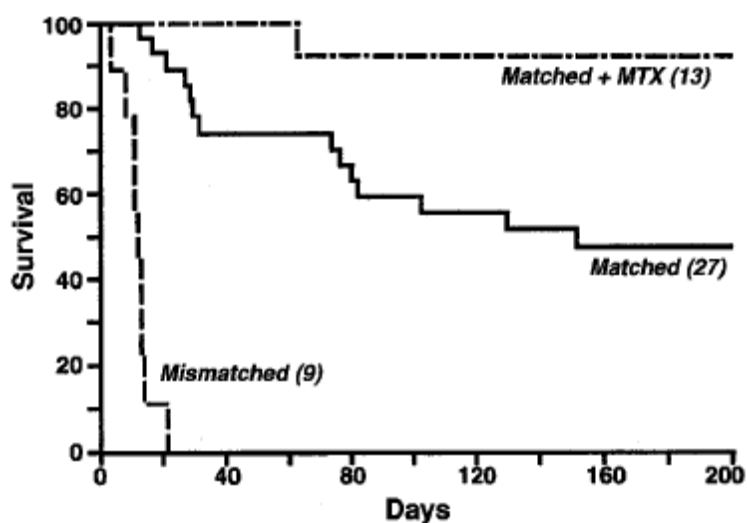
C'est avec la découverte de l'importance du thymus dans la génération de nouvelles cellules lymphoïdes et de leur importance au niveau du système immunitaire que débute la biologie de la transplantation (Good et al., 1962; Miller and Moreman, 1963). Les études chez le chien permirent de mieux cerner les techniques de greffe applicables chez l'humain. Un chien qui recevait ses propres cellules de moelle osseuse récoltées avant l'irradiation avait jusqu'à 4 fois plus de chances de survivre (Cavins et al., 1962; Mannick et al., 1960). On observait également les mêmes problèmes liés à la transplantation que chez la souris : absence de la prise du greffon associé à un rejet de greffe; ou prise du greffon et GVHD suite à une greffe de moelle osseuse allogénique (Lochte et al., 1962). Il était aussi possible de greffer des chiens sans irradiation en utilisant des produits chimiques comme le cyclophosphamide ou le diméthyl busulphan (Storb et al., 1969). Finalement, des greffes de moelle osseuse entre chiens de même portée avaient des taux de succès plus élevés que celles entre des chiens de portées différentes (Epstein et al., 1968, 1969). Ainsi, ces études furent parmi les premières à mettre en évidence l'importance de l'histocompatibilité dans le succès de la greffe de moelle osseuse.

### **3.2. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques pour traiter des cancers**

Ces avancées menèrent au développement d'un programme de greffe de moelle osseuse chez l'humain par E. Donnall Thomas et ses collègues et d'un principe thérapeutique applicable chez l'humain. Ce principe était de traiter des patients atteints de cancers hématologiques avec des doses d'irradiation élevées afin d'éliminer un nombre maximal de cellules cancéreuses. Cette technique entraînait aussi une toxicité irréversible au niveau de la moelle osseuse, et la survie des patients reposait sur l'injection de cellules de moelle osseuse provenant de donneurs sains. Barnes et ses collègues furent les premiers à démontrer l'efficacité de ce procédé pour traiter la leucémie chez la souris (Barnes et al., 1956). Malheureusement, à ses débuts, le programme de transplantation médullaire chez l'humain connut des échecs (Thomas et al., 1957). Seules les greffes hématologiques utilisant un donneur jumeau identique semblaient sécuritaires (Thomas et al., 1959). Néanmoins, ces résultats démontrèrent pour la première fois

que des humains pouvaient être protégés des effets d'une irradiation intensive par l'injection de cellules de moelle osseuse.

La découverte des antigènes de transplantation a finalement permis de franchir la barrière allogénique (Dausset, 1958; Van Rood et al., 1958). L'importance des molécules du *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dans la greffe de moelle osseuse allogénique fut démontrée à l'aide de modèles canins. Des chiens irradiés qui recevaient de la moelle osseuse de donneur incompatible pour les antigènes de transplantation (*Dog Leukocyte Antigen*, DLA) décédaient peu de temps après la greffe de GVHD (Figure 1.4). Par contre, ceux qui recevaient de la moelle osseuse d'un donneur DLA compatible avaient de meilleures chances de survie à long terme. Les chances de survie étaient encore augmentées si on traitait les receveurs au méthotrexate après la greffe de moelle osseuse pour diminuer la GVHD.



**Figure 1.4: Courbe de survie après une greffe de moelle osseuse chez le chien.** Survie de chiens ayant reçu une irradiation totale de 1000 rad et une greffe de moelle osseuse de donneur compatible (matched) ou incompatible (mismatched) pour l'antigène leucocytaire du chien (DLA). MTX : méthotrexate. Tiré de Thomas, 1999.



Chez l'humain, Gatti et ses collègues rapportèrent la première greffe de moelle osseuse allogénique réussie chez un patient atteint d'une immunodéficience grave et greffé en utilisant un donneur apparenté dont le groupe HLA était présumé identique. Des analyses ultérieures démontrèrent que le patient et le donneur possédaient en fait une incompatibilité au niveau d'un seul antigène majeur d'histocompatibilité (Gatti et al., 1968).

Le premier traitement contre la leucémie eut lieu chez un patient en phase blastique d'une leucémie myéloïde chronique. Il fût greffé avec succès avec de la moelle osseuse d'un donneur HLA compatible mais malheureusement décéda de complications associées à une infection par le cytomégalo virus (Buckner et al., 2001). On découvrit également vers la fin des années 1970 que des patients greffés au moment de leur première rémission, ou aux premiers signes de rechutes, voyaient leur chance de survie augmenter davantage (Beutler et al., 1979; Thomas et al., 1979). Malgré des taux de mortalité assez élevés, les premiers résultats démontrèrent que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques permettait de guérir des patients atteints de différentes formes de cancers hématologiques.

### **3.2.1. Les différents types de transplantation de cellules souches**

Comme mentionné précédemment, la transplantation de cellules souches hématopoïétique (*Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, SCT) consiste à transférer des cellules souches d'un donneur à un patient (receveur) ayant reçu des traitements de radiothérapie et/ou chimiothérapie. Ces traitements, qui ont pour objectif d'éliminer les cellules tumorales, engendrent également des dommages à la moelle osseuse saine, causant une perte de l'hématopoïèse. La SCT peut être divisée en deux catégories basées sur la source des CSH : la SCT autologue ou la SCT allogénique.

La SCT autologue implique l'isolation et le transfert des propres CSH du patient. Elle peut être employée pour traiter des cancers hématologiques, des tumeurs solides et même des maladies auto-immunes (Li and Sykes, 2012). La SCT allogénique (*Allogeneic Stem Cell Transplantation*, ASCT) quant à elle implique l'isolation des CSH d'un donneur de la même espèce puis leur transfert dans le patient (Figure 1.5). Ce type de transplantation est utilisée pour

traiter des cancers hématologiques ou solides, des maladies génétiques, des maladies auto-immunes et possiblement pour faciliter la greffe d'organe solide. L'isolation des CSH pour la transplantation peut se faire de différentes façons; soit directement de la moelle osseuse, par ponction; ou bien dans le sang, suite à la mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers le sang; ou encore en utilisant le sang de cordon ombilical.

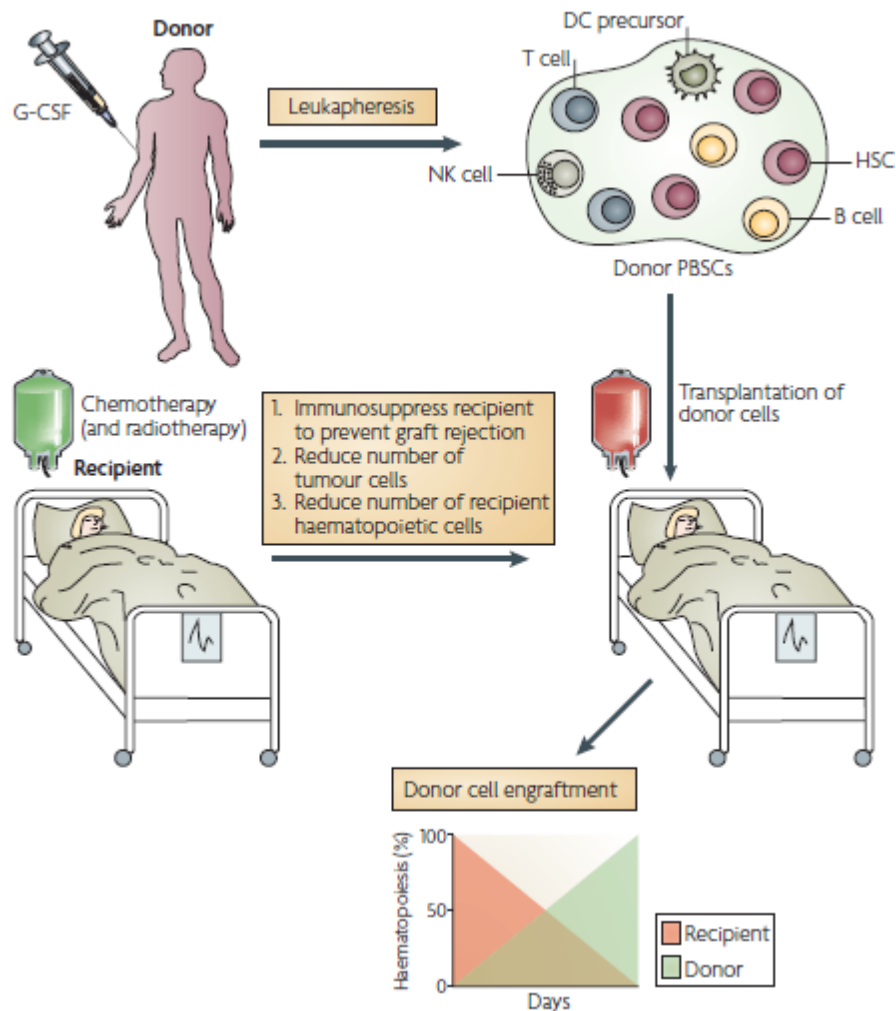
L'avantage principal de l'ASCT est son effet anti-tumoral qui survient lorsque les cellules immunitaires du donneur s'attaquent aux cellules tumorales de l'hôte. Cet effet est toutefois associé à une complication, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) durant laquelle les cellules immunitaires du donneur s'attaquent également aux tissus sains de l'hôte. Le régime de préparation qui précède l'ASCT cause lui-même de la toxicité et de l'inflammation, ce qui accroît l'activation des cellules immunitaires et accentue le développement de la GVHD.

Chez l'humain, l'apparition de la GVHD est directement reliée au niveau de compatibilité des HLA (Park and Seo, 2012; Petersdorf, 2013). Cependant, des receveurs d'une greffe HLA-identique peuvent aussi développer une GVHD dû à des différences génétiques situées en dehors des loci du CMH et qui codent pour des protéines appelées antigènes mineurs d'histocompatibilité (*minor Human Antigen*, miHA) (Korngold and Sprent, 1983; Spierings et al., 2013; Warren et al., 2012). Ces miHA qui sont présentés par le CMH proviennent de protéines encodées par des locus polymorphiques donnant lieu à des différences dans la séquence ou la structure de la protéine entre individus. Il n'existe pour l'instant aucun instrument pour mesurer cette incompatibilité, ce qui rend la GVHD difficile à prédire dans ce contexte.

Les HLA se divisent en deux classes, les HLA de classe I (HLA-A, -B et -C) et HLA de classe II (HLA-DP, -DQ, -DR). Les gènes qui encodent les molécules de HLA sont hautement polymorphiques (Park and Seo, 2012). Lors de la greffe, on essaye de trouver un donneur dont l'ensemble des gènes HLA, appelé haplotype, est identique ou le plus similaire possible à celui du patient. En particulier, la compatibilité au niveau des loci HLA-A, -B, -C et -DRB1 semble la plus importante pour éviter le développement d'une GVHD sévère.

Le choix idéal d'ASCT est l'utilisation des CSH d'un donneur HLA-identique. Avec la taille des familles qui diminue, moins de 30% des patients ont la chance d'avoir un donneur apparenté (Kekre and Antin, 2014). De même, les chances de trouver un donneur non apparenté HLA-

compatible diminuent chez les patients non caucasiens (Oudshoorn et al., 2006). Pour remédier à cette situation, on envisage trois solutions : l'utilisation de CSH de donneur non apparenté HLA-incompatible; la transplantation haploidentique; ou bien la transplantation de CSH de sang de cordon. L'ASCT non apparentée HLA-incompatible est définie comme une transplantation pour laquelle le donneur et le receveur sont incompatibles pour au moins un allèle du HLA. La transplantation haploidentique, elle, réfère à une incompatibilité pour la moitié des allèles du HLA entre le donneur et le receveur. Finalement, la transplantation à partir de sang de cordon consiste à isoler les cellules du sang de cordon ombilical, dans lequel on retrouve une proportion élevée de CSH. Chaque solution a ses avantages et ses inconvénients mais le choix dépendra surtout de la compatibilité entre le donneur et le receveur et la disponibilité du greffon.



**Figure 1.5: Schéma simplifié de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques.** Les cellules souches hématopoïétiques du donneur sont isolées par leucaphérèse, dans cet exemple-ci suite à leur mobilisation par le traitement de G-CSF. Ces cellules sont ensuite transférées au patient qui a reçu ses traitements de chimiothérapie et/ou radiothérapie. On observe après la greffe le remplacement du système hématopoïétique du patient par celui du donneur. Tiré de Shlomchik, 2007.

### 3.4. Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

En 1966, Billingham énonçait trois conditions pour que se développe une GVHD : le greffon devait contenir des cellules immunologiquement compétentes, le receveur devait exprimer des antigènes qui n'étaient pas présents chez le donneur, et le receveur devait être incapable de réagir et d'éliminer les cellules immunocompétentes du greffon (Billingham, 1966). Nous savons désormais que ces cellules immunologiquement compétentes sont les LT et qu'ils peuvent à eux seuls induire une GVHD dès qu'ils sont transférés dans un receveur qui ne peut pas les éliminer (Drobyski and Majewski, 1996; Hervé et al., 1987; Kernan et al., 1986; Sprent et al., 1986).

On distingue deux types de GVHD, la GVHD aiguë et la GVHD chronique. Les deux types ont des étiologies et des pathophysiologies distinctes. La GVHD aiguë a été à la base décrite comme une maladie apparaissant dans les 100 jours post-greffe et la GVHD chronique apparaissant plus tardivement. Cette définition basée uniquement sur un critère temporel est loin d'être parfaite puisque nous savons maintenant que certaines formes de GVHD aiguë apparaissent plus tard. Ainsi, les signes cliniques et les organes atteints constitueraient de meilleurs indicateurs quant au type de GVHD.

La prévalence de la GVHD aiguë dépend en grande partie du degré de compatibilité entre le donneur et le receveur. La prévalence peut varier de 35-45% chez les receveurs d'une greffe complètement compatible (d'un frère ou d'une sœur donneur) à 60-80% suite à une greffe de donneur non apparenté incompatible au niveau d'un antigène HLA (Flomenberg et al., 2004; Loiseau et al., 2007; Shaw et al., 2010). Les régions les plus touchées par la GVHD aiguë sont la peau (81% des patients), le tube gastro-intestinal (54% des patients) et le foie (50% des patients) (Martin et al., 1990). Les poumons, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires sont souvent également affectés. La GVHD aiguë peut être divisée en quatre stades, dépendamment de l'atteinte des organes cibles et de la gravité des dommages. Le stade 1 représente une maladie de faible intensité, avec une atteinte cutanée sur environ 25% de la peau. Au stade 2, la gravité de la GVHD est considérée comme moyenne, 50% de la peau est affectée, le foie peut commencer à être touché et le patient peut avoir une faible diarrhée et des nausées. Au stade 3, la GVHD s'aggrave, plus de 50% de la peau est affectée, le foie est atteint et le

patient a des crampes abdominales et de la diarrhée. Finalement, le stade 4 est considéré comme très grave. À ce stade, la peau peut avoir des cloques et le patient devient ictérique. Les stades 3 et 4 ont un mauvais pronostic, la survie à long terme (4 ans post-greffe) au stade 3 n'est que de 25% tandis qu'elle n'est que de 5% au stade 4 (Cahn et al., 2005).

### **3.4.1. Modèles animaux**

La majeure partie de nos connaissances sur la GVHD provient de modèles animaux. L'utilisation de modèles de souris génétiquement identiques a permis de détailler les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans cette réaction. Il faut cependant noter que, dans le contexte d'une étude sur la GVHD, il existe plusieurs disparités entre la souris et l'humain tant au niveau cellulaire qu'au niveau expérimental qu'il faut prendre en compte lorsque l'on interprète les résultats. Les différences cellulaires incluent entre autres des ratios différents des sous-types de cellules immunitaires, l'expression disparate de récepteurs et de molécules de costimulation ainsi que la production ou la fonction variée de cytokines ou chimiokines (Mestas and Hughes, 2004). Au niveau expérimental, il y a six facteurs principaux qu'il faut considérer lorsque l'on convertit les résultats des modèles murins vers l'humain (Schroeder and DiPersio, 2011; Socié and Blazar, 2009) :

- 1) Le régime de préparation chez l'humain comprend principalement un traitement de chimiothérapie combiné ou non à un traitement de radiothérapie. Ces traitements sont généralement administrés en doses multiples permettant ainsi de diminuer la toxicité et l'inflammation qui les accompagnent. Le régime de préparation chez la souris consiste quant à lui en un seul traitement de radiothérapie administré en une ou deux doses généralement beaucoup plus élevées. L'inflammation et les dommages tissulaires causés par le régime de préparation sont donc différents entre l'humain et la souris et influencent la gravité de la GVHD.
- 2) Les différences génétiques et immunitaires entre le donneur et le receveur influencent également la gravité de la GVHD. Chez l'humain, le donneur et le receveur sont généralement associés selon leur compatibilité pour les antigènes majeurs du CMH (HLA) et ne diffèrent qu'au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité. Chez la souris, la plupart des modèles

impliquent une incompatibilité majeure au niveau du CMH. De plus, il existe une multitude de lignées de souris qui ont chacune des ratios différents de cellules immunitaires pouvant aussi affecter la GVHD. Finalement, le fond génétique qui peut varier entre ces lignées influence la gravité de la GVHD.

3) La source des cellules immunitaires du donneur. Chez l'humain, la source de CSH utilisée pour la greffe provient soit de la moelle osseuse ou soit du sang périphérique. Ces deux types de greffons contiennent des cellules immunitaires dont le nombre peut varier. Chez la souris, les cellules immunitaires injectées avec la moelle osseuse sont généralement isolées à partir de la rate ou des ganglions lymphatiques d'une souris donneuse. Ces cellules provenant de sources variables présentent des proportions différentes de sous-types cellulaires ainsi que des propriétés de migration distincte, ce qui peut aussi influencer le développement de la GVHD.

4) La flore microbienne et les pathogènes influencent la gravité de la GVHD. Le régime de préparation chez l'humain cause des dommages au niveau du tube digestif, ce qui entraîne la relâche de microorganismes qui contribuent à la gravité de la GVHD. D'ailleurs, l'intestin constitue l'un des principaux organes touchés par la GVHD. À l'inverse, les souris sont logées depuis leur naissance dans des environnements exempts de pathogènes. Par conséquent, l'impact de la flore intestinale sur la GVHD risque d'être beaucoup plus important chez l'humain que chez la souris.

5) L'âge affecte la thymopoïèse ainsi que la sensibilité aux radiations (Ordemann et al., 2002). Alors que les greffes de CSH chez l'humain se font principalement à l'âge adulte, l'âge des souris auquel on étudie la GVHD est généralement de 8 à 12 semaines sur une durée de vie de 2 ans. De plus, le thymus de la souris est plus résistant à l'irradiation et peut possiblement encore produire de nouveaux LT dans un contexte sans GVHD.

6) La prophylaxie post-greffe diminue généralement la gravité de la GVHD. Suite à une greffe de moelle osseuse allogénique, les humains reçoivent des traitements de prophylaxie avec des immunosuppresseurs qui atténuent l'activation du système immunitaire et diminuent la gravité de la GVHD. Chez la souris, nous utilisons rarement des traitements immunosuppresseurs, ce qui peut contribuer à augmenter la gravité de la GVHD.

### 3.4.2. Pathophysiologie de la GVHD aiguë

Dès maintenant dans le texte, le terme GVHD se rapportera à la GVHD aiguë.

La progression de la GVHD peut être divisée en trois étapes principales: 1) le dommage tissulaire causé par le régime de préparation, 2) l'activation des LT du donneur et 3) les dommages infligés aux tissus cibles par les LT du donneur (Figure 1.6).

La réponse immunitaire est déclenchée suite aux dommages causés par le régime de préparation (Figure 1.6). Les tissus endommagés libèrent des cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1) ou le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) et des chimiokines qui vont entraîner l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (*Antigen Presenting Cells*, APC) et l'augmentation de l'expression de molécule d'adhésion, de costimulation ainsi que du CMH (Antin, 2001; Xun et al., 1994). Les dommages causés au niveau du tube gastro-intestinal vont également entraîner la translocation de produits microbiens comme le lipopolysaccharide (LPS) et autres molécules associées aux pathogènes (PAMPs) qui vont accentuer l'activation des DC par signalisation via leur TLR (Cooke et al., 2001; Hill and Ferrara, 2000; Hill et al., 1997).

La deuxième étape, l'activation des LT du donneur, débute avec l'identification par le TCR des antigènes d'histocompatibilité de l'hôte présentés par les APC de l'hôte (Chakraverty and Sykes, 2007) (Figure 1.6). Les LT activés se mettent alors à proliférer et à acquérir leur fonction effectrice, sécrétant de l'IFN $\gamma$  et exprimant la molécule Fas. Les cytokines proinflammatoires entraînent également l'activation d'autres cellules effectrices comme les neutrophiles, les monocytes, les cellules NK et les macrophages, ces derniers pouvant sécréter de l'IL-1, du TNF- $\alpha$  et de l'oxyde nitrique.

La troisième étape est définie comme étant la destruction des tissus cibles par des médiateurs cellulaires (LT cytotoxiques, cellules NK) et solubles (cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 ou l'interféron  $\gamma$ , perforine et granzime) (Figure 1.6). Ces dommages amplifient la relâche de cytokines proinflammatoires ce qui contribue à accentuer la GVHD.



### **3.4.2.1. Cellules présentatrices d'antigènes et présentation antigénique**

Les travaux effectués chez la souris ont démontré que les APC hématopoïétiques du receveur sont nécessaires pour activer les LT CD8<sup>+</sup> tandis que les LT CD4<sup>+</sup> peuvent être aussi activés par les APC non hématopoïétiques (les cellules stromales) du receveur (Koyama et al., 2012; Shlomchik et al., 1999; Toubai et al., 2012). Bien qu'il ait été démontré que les DC du receveur jouent un rôle clé dans la présentation des Ag de l'hôte aux LT du donneur, plusieurs études ont conclu que ces cellules ne sont pas nécessaires au développement de la GVHD (Duffner et al., 2004; Koyama et al., 2012; Li et al., 2012; Lin et al., 2014; Teshima et al., 2002a; Toubai et al., 2012). Cependant, il demeure que les DC du donneur jouent un rôle clé dans la présentation des Ag de l'hôte et le maintien de la GVHD, celle-ci une fois enclenchée (Markey et al., 2009, 2014; Matte et al., 2004; Wang et al., 2011).

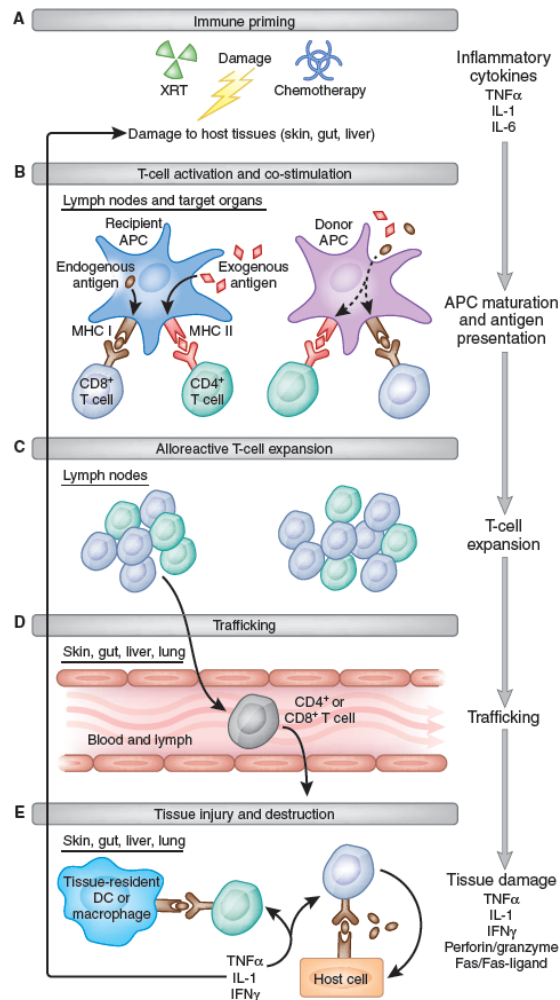
### **3.4.2.2. Sous-type de lymphocytes T impliqués**

Les lymphocytes T détenant une chaîne alpha et bêta du TCR (LT  $\alpha\beta$ ) sont les acteurs principaux de la GVHD. En effet, l'élimination de ces cellules diminue radicalement l'incidence de la GVHD chez la souris, le chien et l'humain (Truitt and Atasoylu, 1991; Yu et al., 2006). Suite à une greffe de moelle osseuse CMH-incompatible, les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> peuvent induire une GVHD. Dans le cas d'une greffe CMH-compatible, les LT CD8<sup>+</sup> semblent jouer un rôle plus important dans la GVHD alors que les LT CD4<sup>+</sup> peuvent dans certains cas supporter l'activation des LT CD8<sup>+</sup> et participer à l'induction de la GVHD (Shlomchik, 2007; Yu et al., 2006).

Chez la souris, il a été démontré que les LT<sub>n</sub> et les LT<sub>CM</sub> peuvent induire la maladie mais qu'à l'inverse les LT<sub>EM</sub> en sont incapables (Anderson et al., 2003; Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2009). Une des hypothèses pour expliquer que les LT<sub>EM</sub> ne peuvent pas induire une GVHD est qu'ils n'expriment pas le CD62L ou le CCR7 et n'ont pas la possibilité de migrer vers les ganglions lymphatiques ou les plaques de Payer pour s'activer. Cependant, des LT<sub>n</sub> qui n'expriment pas le CD62L et le CCR7 peuvent quand même déclencher une GVHD, supposément en s'activant dans le foie ou la moelle osseuse (Anderson et al., 2008). Les LT<sub>EM</sub> ont par contre l'avantage d'induire tout de même une réponse antitumorale (Zheng et al., 2008).

### 3.4.2.3. Importance de la costimulation

Les molécules de costimulation jouent un rôle important dans l'activation des LT et le déclenchement de la GVHD. L'absence de costimulation entraîne généralement l'anergie des LT. Dans un contexte de GVHD, l'inflammation active les APC qui, suite à ce stimulus, augmentent l'expression des molécules de costimulation. L'interaction entre le récepteur CD28 exprimé sur les LT et ses ligands CD80 et CD86 exprimés sur les APC permet l'activation des LT. D'ailleurs, l'inhibition de cette interaction par des molécules antagonistes des ligands B7 ou par des Ig-CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), permet de réduire considérablement l'intensité de la GVHD (Blazar et al., 1994; Hakim et al., 1995; Yu et al., 2000). La molécule *Inducible Costimulator* (ICOS), une autre molécule de costimulation, interagit avec le ligand B7H exprimé à la surface des APC et stimule la réponse effectrice. L'inhibition de l'interaction d'ICOS avec B7h diminue aussi la gravité de la GVHD (Li et al., 2011a; Taylor et al., 2005). La molécule *Program death-1* (PD-1) est un frein naturel des LT activés (comme CTLA-4) et son absence est associée à une production accrue d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) ainsi qu'à une aggravation de la GVHD. La famille des récepteurs du *Tumor Necrosis Factor* (TNF) joue aussi un rôle important dans la GVHD et l'inhibition du TNF $\alpha$  par l'utilisation d'anticorps monoclonaux démontre une certaine efficacité pour diminuer les signes cliniques de la GVHD.



**Figure 1.6 : Étapes de la GVHD aiguë chez la souris.** La progression de la GVHD peut être divisée en trois étapes principales, A) Les dommages tissulaires induits par la radiothérapie et libération de cytokines proinflammatoires B-D) activation, prolifération et migration des LT alloréactifs et E) destruction des tissus cibles. Tiré de Schroeder and DiPersio, 2011

La molécule OX40 exprimée sur les LT activés semble aussi contribuer à la GVHD lorsque celle-ci se lie avec son ligand OX40L exprimé sur les APC (Blazar et al., 2003; Tsukada et al., 2000). CD40L, qui n'est exprimé que sur les LT CD4<sup>+</sup> activés, contribuerait aussi à la gravité de la GVHD (Blazar et al., 1997; Buhlmann et al., 1999). 4-1BB présente quant à lui un potentiel intéressant pour contrôler la GVHD puisque son inhibition réduit considérablement la gravité de la GVHD causée par les LT CD8<sup>+</sup> (Wang et al., 2009; Blazar et al., 2001a; Nozawa et al., 2001).

#### **3.4.2.4. Migration des lymphocytes T**

Suite à l'ASCT, les LT du donneur contenus dans le greffon vont migrer vers les organes lymphoïdes où ils vont recevoir des signaux d'activation de la part des APC du receveur (Negrin et Contag, 2006). Une fois activés, ces lymphocytes vont se diriger vers les tissus cibles et causer la pathologie propre à la GVHD. Presque tous les tissus expriment des antigènes qui peuvent être reconnus par les LT alloréactifs. Pourtant, la GVHD est limitée à des organes bien précis, le tube digestif, la peau, le foie, les poumons et les organes lymphoïdes secondaires (Ferrara et al., 2009; Shlomchik, 2007; Socié and Blazar, 2009). Ceci suppose que les LT migrent vers ces sites grâce à une combinaison de signaux et de récepteurs bien spécifiques. Il faut aussi mentionner que ces organes renferment un nombre impressionnant d'APC, ce qui pourrait expliquer en partie la prédisposition de ces organes à la GVHD.

Vu l'importance des organes lymphoïdes secondaires dans l'activation des LT alloréactifs, des chercheurs ont mis au point une molécule, le fingolimod (FTY720), qui entraîne la sous-expression du récepteur S<sub>1</sub>P<sub>1</sub>, ce qui empêche les LT de sortir des organes lymphoïdes. Chez la souris et le rat, l'utilisation du FTY720 diminue considérablement le développement de la GVHD (Hashimoto et al., 2007; Song et al., 2006). Cependant, l'administration du même composé chez le chien ne semble pas avoir d'effets bénéfiques et les essais cliniques chez l'humain ont été annulés en raison de toxicité (Lee et al., 2003; Socié and Blazar, 2009).

### 3.4.2.5. Fonctions effectrices des lymphocytes T

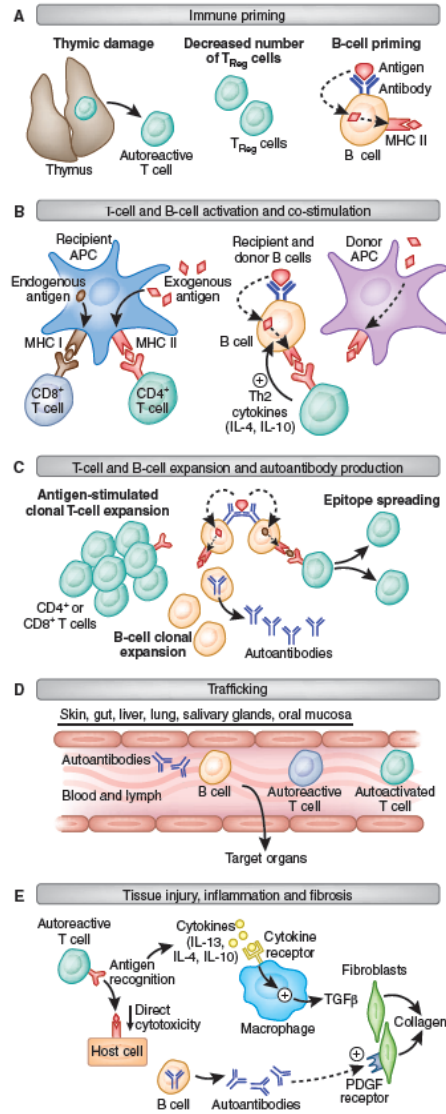
Suite à l'ASCT, l'expression des antigènes de l'hôte par ses APC est nécessaire afin d'activer les LT du donneur. Dans des greffes de moelle osseuse CMH-incompatible, les dommages induits aux organes par les LT activés ne nécessitent pas de présentation de ces antigènes sur les tissus cibles (Teshima et al., 2002a). Les LT CD4<sup>+</sup> peuvent induire une GVHD sans contact direct car la maladie serait en partie causée par la sécrétion de cytokines telles l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-1. D'ailleurs, l'IFN $\gamma$  active les neutrophiles, cellules NK, monocytes et APC et augmente la présentation des antigènes du soi par les cellules non immunitaires de l'hôte, ce qui contribue à accentuer la GVHD. Dans un contexte CMH-compatible, seuls les LT CD8<sup>+</sup> requièrent un contact avec les tissus pour induire des dommages (Matte-Martone et al., 2008). En effet, les LT CD8<sup>+</sup> requièrent généralement une interaction avec l'antigène pour relâcher des perforines, granzymes et exprimer Fas ligand (FasL). Cependant, des LT déficients en FasL et perforine peuvent encore induire une GVHD, ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes qui contribuent à la GVHD (Marks et al., 2004). On peut penser par exemple à des cytokines comme le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ , ou sinon à d'autres ligands induisant l'apoptose comme ceux faisant partie de la famille des *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL).

### 3.4.3. Pathophysiologie de la GVHD chronique

La pathophysiologie de la GVHD chronique est moins bien comprise que celle de la GVHD aiguë, en partie à cause du nombre limité de modèles animaux pour l'étudier (Linhares et al., 2013; Socié and Ritz, 2014). La GVHD chronique ressemble davantage à une maladie auto-immune. En plus de s'attaquer aux organes cibles de la GVHD aiguë, la GVHD chronique s'étend aux muqueuses et aux glandes. Les modèles de développement de la maladie impliquent trois mécanismes pathologiques principaux: la production d'auto-anticorps, des voies de signalisation profibrotiques et une fonction thymique défectueuse. Comparée à la GVHD aiguë, la réponse immunitaire déclenchée dans la GVHD chronique n'est pas causée par des dommages tissulaires (Figure 1.7). D'ailleurs, l'inflammation est généralement diminuée dans la GVHD chronique. Ce serait, entre autres, les dommages thymiques lors de la GVHD aiguë qui pourraient être responsables d'une sélection négative déficiente, ce qui entraînerait la génération

de LT autoréactifs (Zhang et al., 2007). À ce stade, l'activation des LT ne dépend plus des APC du receveur mais bien des APC produits à partir des CSH du donneur qui présentent des antigènes du receveur.

La présence des LT CD4<sup>+</sup> semble être nécessaire et suffisante pour induire la GVHD chronique (Zhang et al., 2006). Les LT CD4<sup>+</sup> serviraient à soutenir la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B par la sécrétion de cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Les LT et B une fois activés peuvent migrer vers les organes cibles et induire de la fibrose et une inflammation chronique.



**Figure 1.7 : Étapes de la GVHD chronique chez la souris.** La progression de la GVHD chronique peut-être divisée en cinq étapes principales, A) l'activation des LT et B, B-D) activation, prolifération et migration des LT et B, et E) destruction des tissus cibles par inflammation chronique et fibrose. Tiré de Schroeder and DiPersio, 2011.

## **3.5. GVL et contrôle de la GVHD**

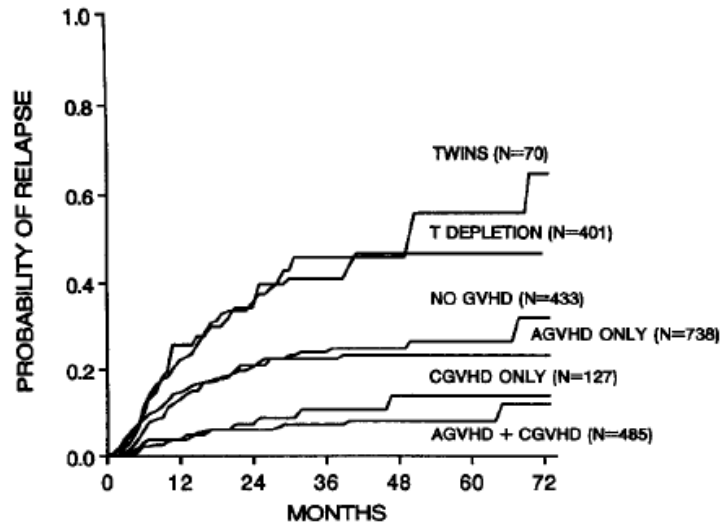
### **3.5.1. La réaction du greffon contre la leucémie (GVL)**

L'histo-incompatibilité à la base de la GVHD est également responsable d'un effet bénéfique appelé réaction du greffon contre la leucémie (*Graft-Versus-Leukemia*, GVL) où les cellules cancéreuses résiduelles, c.-à-d. les cellules qui ont échappé à la chimiothérapie, sont reconnues et détruites par les LT alloréactifs et les cellules NK du donneur (Kolb et al., 1995). En effet, dès les débuts de l'ASCT, il a été observé que des patients greffés à partir de CSH de donneur HLA-incompatible avaient moins de rechutes leucémiques que des patients greffés avec des CSH d'un donneur HLA-compatible (Weiden et al., 1979). On sait maintenant que les LT alloréactifs ont la capacité d'éliminer les cellules leucémiques. Ainsi, les probabilités de rechute leucémique suite à une ASCT syngénique (jumeaux identiques) ou une ASCT sans LT sont d'environ 50-60% cinq ans après la greffe (Horowitz et al., 1990) (Figure 1.8). À l'inverse, les patients greffés avec de la moelle osseuse allogénique ont environ 30% de chances de faire des rechutes s'ils n'ont pas de GVHD et environ 20% s'ils en sont atteints. Les probabilités de rechutes diminuent encore si les patients sont atteints de GVHD chronique seule ou en combinaison avec une GVHD modérée. Malheureusement, cet effet bénéfique ne supplante pas l'effet délétère de la GVHD. Le défi est présentement de séparer la réaction GVL de la réaction GVHD (Falkenburg and Warren, 2011; Kolb, 2008).

### **3.5.2. Prophylaxie de la GVHD**

Les régimes de préparation à intensité réduite (ou non-myéloablatifs) permettent de diminuer considérablement les dommages tissulaires et la relâche de cytokines proinflammatoires qui jouent un rôle clé dans le déclenchement de la GVHD (Gyurkocza and Sandmaier, 2014). En effet, les études cliniques ont démontré une diminution de la fréquence de GVHD grave (stades 2 à 4) suite à ce type de régime (Couriel et al., 2004; Levine et al., 2003; Pérez-Simón et al., 2005). Cependant, la GVHD peut apparaître plus tard et pourrait se superposer à la GVHD chronique.





**Figure 1.8 : Probabilité de rechute leucémique après une ASCT dépendamment du type de greffe et de GVHD.** Tiré de Horowitz et al., 1990.

Les LT sont les acteurs principaux de la GVHD. Différentes stratégies de prophylaxie visent à éliminer ou à bloquer l'action de ces cellules. Il existe trois techniques principales d'élimination des LT : 1) une déplétion des LT *ex vivo* (*purging*), 2) la sélection positive des cellules souches CD34<sup>+</sup> *ex vivo* et 3) des anticorps contre les LT *in vivo* (Ferrara et al., 2009). Toutes ces techniques permettent une diminution importante de la GVHD mais entraînent une augmentation du rejet de greffe, de rechutes leucémiques et des infections. En effet, certaines études ont démontré que la déplétion des LT était associée à des chances de survie plus faible qu'une immunosuppression standard chez des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse allogénique (Champlin et al., 2000).

Une technique d'élimination des LT *in vivo* est l'utilisation de globulines anti-lymphocyte. Ces globulines sont isolées à partir du sérum de cheval ou de lapin et qui contient des titres élevés d'anticorps polyclonaux dirigés contre les LT du donneur. Cependant les effets biologiques varient considérablement entre individus et les effets négatifs incluent de la fièvre, des maux de tête, de la thrombocytopénie (réaction croisée avec les plaquettes) et quelquefois un choc anaphylactique (Bacigalupo, 2005). On utilise plus souvent de hautes doses de cyclophosphamide, administrées après l'ASCT et ayant comme objectif d'éliminer les cellules

qui prolifèrent rapidement, c.-à-d. les LT alloréactifs, et d'épargner les CSH et les Tregs (Kanakry et al., 2013).

Plusieurs techniques pharmacologiques visent à bloquer l'action des LT en inhibant leur activation (Holtan et al., 2014). Le méthotrexate fut le premier agent prophylactique utilisé à grande échelle suivi de la cyclosporine, un inhibiteur de la calcineurine. De nos jours, le traitement prophylactique classique comprend un inhibiteur de la calcineurine (comme la cyclosporine ou le tacrolimus qui semble être plus efficace) combiné au méthotrexate ou au mycophénolate mofetil (qui semble avoir une plus faible toxicité que le méthotrexate).

Finalement, un traitement de plus en plus répandu pour faire face à la GVHD est la photophérèse extracorporelle. Ce traitement consiste à prélever les lymphocytes du patient en GVHD par leucaphérèse et de les marquer avec un agent intercalant l'ADN, le 8-méthoxypsoralène, qui sous l'action des rayons UVA deviendra cytotoxique et les éliminera. Dans une étude de phase II portant sur la photophérèse corporelle dans les cas de GVHD résistante aux stéroïdes, la maladie a régressé chez 50% des patients, améliorant ainsi leur survie à long terme (Greinix et al., 2006). De manière similaire, le 4,5-dibromorhodamine-123, communément appelé TH9402, est utilisé avant la greffe de moelle osseuse pour éliminer spécifiquement les LT qui causent la GVHD. Suite à une activation *ex vivo* des cellules du donneur contre les cellules du receveur, le TH9402 est préférentiellement retenu à l'intérieur des LT activés. Lorsque les cellules sont exposées à la lumière, les LT activés sont éliminés (Guimond et al., 2002). Ce procédé fait également l'objet d'études cliniques.

### **3.5.3. Traitement de la GVHD**

La GVHD apparaît généralement dans les semaines ou les mois suivants l'ASCT. Le traitement standard est l'utilisation de corticostéroïdes qui diminue l'inflammation et la prolifération des LT. Cependant, l'utilisation de corticostéroïdes entraîne une diminution des signes cliniques de la GVHD chez moins de 50% des patients et les GVHD graves ont moins de chance de répondre au traitement (MacMillan et al., 2002). Il n'existe pour l'instant pas de

traitements standards pour ces GVHD réfractaires. En général, le patient reçoit de l'ATG (*anti-thymocyte globulin*) ou des inhibiteurs du TNF (comme l'etanercept) (Holtan et al., 2014).

Différentes approches, que l'on peut diviser selon leur nature pharmacologique ou cellulaire, sont présentement en essais cliniques ou précliniques (Magenau and Reddy, 2014; Wolf et al., 2012). Au niveau pharmacologique, les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACi) ont démontré un effet substantiel sur l'activation des DC et l'expansion des Tregs, permettant de réduire la GVHD chez la souris (Choi et al., 2015; Reddy et al., 2008). Plusieurs traitements ciblant l'activation des LT, comme l'inhibition de l'IL-21, du TNF $\alpha$ , du facteur de transcription STAT1, de la protéine PKC $\theta$  ou des inhibiteurs du protéasome sont également en cours de validation (Blanco et al., 2006; Gatza et al., 2014; Haarberg et al., 2013; Lim et al., 2015; Ma et al., 2011). Finalement, il a été récemment démontré que l'interruption de la voie de signalisation Notch sur les LT alloréactifs empêche le développement de la GVHD (Sandy et al., 2013; Tran et al., 2013; Zhang et al., 2011).

Au niveau cellulaire, le transfert, ou l'expansion, des Tregs démontre des effets prometteurs quant à la prévention de la GVHD, sans affecter la GVL (Ianni et al., 2011; Shin et al., 2011). Les cellules *Natural Killer T cells* (NKT) pourrait également avoir un effet bénéfique sur la GVHD, certainement en influençant la différenciation des LT en LT Th2 ou le développement des Tregs, diminuant la capacité à induire une GVHD (Leveson-Gower et al., 2011; Schneidawind et al., 2014). Finalement, l'injection de cellules stromales mésenchymales (MSC) semble donner de bons résultats chez des patients atteints d'une GVHD résistante aux corticostéroïdes (55% de réponse dans une étude de phase II) (Le Blanc et al., 2008; Kim et al., 2013). Toutefois, le mécanisme d'action des MSC n'est toujours pas connu.

### **3.6. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et reconstitution immunitaire**

Suite à l'ASCT, on observe des comptes très faibles de cellules immunitaires chez les patients greffés. La reconstitution du système immunitaire dépend de plusieurs facteurs : de facteurs pré-greffe (âge, maladies, donneur de CSH); de facteurs pendant la greffe (régime de préparation, source des CSH, manipulation sur le greffon); et de facteurs post-greffe (GVHD, infections, traitements immunosuppresseurs). C'est durant cette période d'immunosuppression que les patients sont le plus exposés aux rechutes leucémiques (Le Blanc et al., 2009; Savani et al., 2006) ou aux infections virales, bactériennes ou fongiques. D'ailleurs, les infections sont responsables d'environ 35 à 45% de la mortalité suite à une ASCT (Parody et al., 2015). Les acteurs principaux de ces infections opportunistes sont, au niveau viral, les virus Herpès, cytomégalovirus, varicelle et Epstein Barr; au niveau bactérien, les bactéries gram positives et négatives ainsi que les bactéries encapsidées; et au niveau fongique, les espèces du groupe *Candida* et *Aspergillus* (Mackall et al., 2009).

#### **3.6.1. Reconstitution du système inné et des lymphocytes B**

Il est à noter que la présente section se base sur les études faites chez l'adulte, après une ASCT utilisant des CSH, indépendamment du régime de préparation ou de l'histocompatibilité.

De manière générale, les cellules du système inné se régénèrent plus rapidement que les cellules du système adaptatif (Figure 1.9). Les comptes de neutrophiles, comme ceux des monocytes, augmentent rapidement après l'ASCT pour se normaliser quelques mois après (Bensinger et al., 1996). Quant aux NK, on commence à les retrouver quelques mois après la greffe (Storek et al., 2001a).

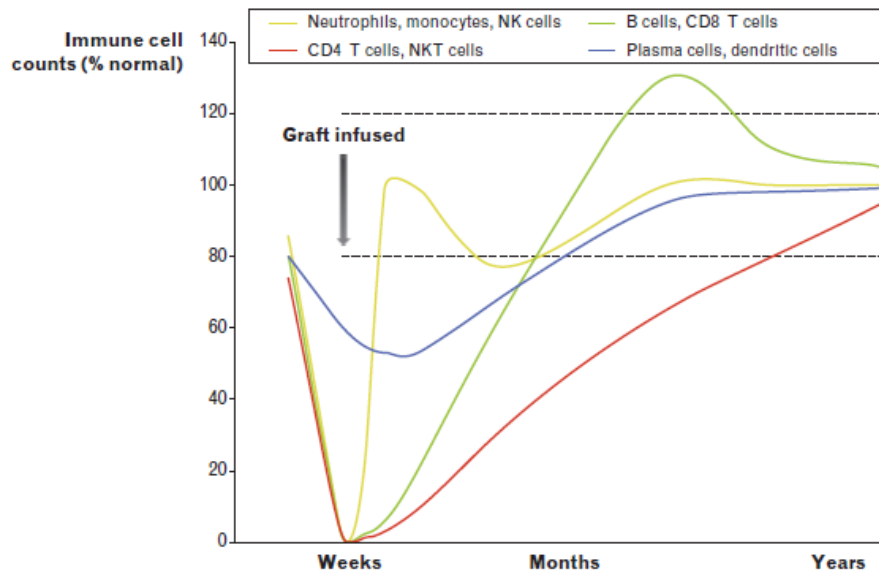
Le nombre de DC, et particulièrement les pDC, est bas pour une période de 6 à 18 mois post-ASCT (Arpinati et al., 2004; Chang et al., 2012; Takebayashi et al., 2004). Plus précisément, le compte de pDC et mDC semble augmenter légèrement dans les premières semaines qui suivent la greffe pour graduellement diminuer et se maintenir bien en dessous des normales (Horváth et

al., 2009) (Figure 1.9 et Tableau II). Cette augmentation précoce pourrait être due aux niveaux élevés de Flt3-L détectés au moment de l'ASCT (Chklovskaja et al., 2004).

Les lymphocytes B sont complètement absents pendant les premiers mois post-ASCT et ne sont reconstitués que 1 à 2 ans après la transplantation (Scarselli et al., 2015). Comme pour les autres cellules, la GVHD et les traitements d'immunosuppression ralentissent leur reconstitution (Storek et al., 2001b). De plus, le répertoire de lymphocytes B est restreint pendant au moins 1 an post-transplantation, limitant la réponse contre les infections et la production d'anticorps suite à une première dose de vaccination (Chou et al., 2011; Glas et al., 2000; Gueller et al., 2011).

### **3.6.2. Reconstitution des lymphocytes T**

Indépendamment du type d'ASCT, les patients subiront une perte quasi complète de leur population de LT post-greffe. Plusieurs facteurs sont responsables de cette lymphopénie: 1) le régime de préparation avant la greffe suivi du traitement d'immunosuppression pour maîtriser l'activation des LT rendent les patients extrêmement immunosupprimés; 2) le nombre restreint de LT injectés avec le greffon ne permet pas une reconstitution optimale du réservoir de LT; 3) la GVHD elle-même entraîne une diminution substantielle de la reconstitution immunitaire des LT (Castermans et al., 2011; Chung et al., 2001; Weinberg et al., 2001).



**Figure 1.9: Compte approximatif des cellules immunitaires (exprimé en % des comptes normaux) avant et après transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques.** Tiré de Bosch et al., 2012

Il existe deux façons de régénérer des LT chez un patient greffé : par la PH des LT matures contenus dans le greffon qui réagissent à la lymphopénie et par la production *de novo* de LTn dérivés de la moelle osseuse du donneur et produits par le thymus du patient. La production *de novo* de LT permettrait de générer des LT dérivés du donneur tolérants envers l'hôte et détenant un répertoire TCR étendu. Malheureusement, la fonction thymique décroît relativement tôt chez l'humain et la production de nouveaux LT à partir du thymus est très faible chez l'adulte (Lynch et al., 2009). De plus, le régime de préparation ainsi que la GVHD endommagent le thymus et empêchent le développement de nouveaux LT (Fu et al., 2007; Krenger et al., 2011; Mackall et al., 2009; Ringhoffer et al., 2013; Weinberg et al., 2001). Dans ce contexte, la PH des LT du greffon devient l'unique moyen de reconstituer la population de LT. En plus du faible nombre de LT, le répertoire de ces cellules est très limité post-greffe, ce qui accentue l'immunosuppression et les risques d'infections (Gorski et al., 1994; Mackall et al., 1996; Talvensaar et al., 2002).

À la différence des autres cellules immunitaires, la régénération des LT ne suit pas l'ontogénie habituelle. En effet, la majorité des LT retrouvés après l'ASCT sont de type mémoire/effecteur (Weinberg et al., 2001) tandis que le nombre de LTn peut être bas pendant plusieurs années, voire des décennies, post-greffe (Le et al., 2011; Storek et al., 2001c). Pour des raisons obscures, la reconstitution des LT CD8<sup>+</sup> est plus efficace que celle des LT CD4<sup>+</sup> (Figure 1.9 et Tableau II) (Mackall et al., 1995; Storek et al., 1997). En effet, ces derniers peuvent prendre plusieurs années avant de revenir à des nombres normaux tandis que le nombre de LT CD8<sup>+</sup> semble se restaurer dans les mois qui suivent l'ASCT (Federmann et al., 2011; Fujimaki et al., 2001; Heining et al., 2007; Klyuchnikov et al., 2010; Puissant-Lubrano et al., 2014; Storek et al., 2008; Xhaard et al., 2014).

### **3.6.3. Traitements pour faciliter la reconstitution immunitaire**

Comme nous l'avons vu précédemment, les rechutes et les infections sont, avec la GVHD, les grands responsables de la morbidité et de la mortalité associées à l'ASCT. Il est donc crucial de développer des thérapies permettant d'accélérer la reconstitution immunitaire ou la réponse immunitaire des patients greffés. Ces thérapies peuvent être divisées en deux groupes, celles modulant la reconstitution immunitaire ou celle impliquant le transfert de cellules déjà fonctionnelles (van den Brink et al., 2004; Chang et al., 2014; Mackall et al., 2009; Seggewiss and Einsele, 2010; Tzannou and Leen, 2014).

**Tableau II : Résumé de la reconstitution post-greffe des principaux sous-types étudiés dans cette thèse. Adapté de Bosch et al., 2012.**

Type cellulaire	Durée de reconstitution	Sous-types	Répertoire	Origine	Bibliographie
Lymphocytes T CD4+	Années	1-5 ans pour mémoires/effecteurs > 5 ans pour naïfs	Oligoclonal au début Dépend de la reprise thymique	3-6 mois : LT du donneur contenus dans le greffon > 6 mois : En faible partie par HSC du donneur si reprise thymique	Weinberg et al., 2001; Le et al., 2011; Storek et al., 2001c; Mackall et al., 1995; Storek et al., 1997; Federmann et al., 2011; Fujimaki et al., 2001; Heining et al., 2007; Klyuchnikov et al., 2010; Puissant-Lubrano et al., 2014; Storek et al., 2008; Xhaard et al., 2014
Lymphocytes T CD8+	Mois-années	2-6 mois pour mémoires/effecteurs > 1 an pour naïfs	Idem aux CD4+	Idem aux CD4+	Idem au CD4+
Cellules dendritiques	Mois-années	1-12 mois pour mDC1 et mDC2 > 1 an : pDC et rechute observée des mDC1 et mDC2	ND	ND	Horvath et al. 2009; Arpinatie et al. 2004; Damiani et al. 2003; Peric et al. 2015; Rajasekar et al. 2012; Takebayashi et al. 2004; Chang et al. 2012; Fearnley et al. 1999

### 3.6.3.1. Stimuler la régénération in vivo des cellules

Il est connu depuis longtemps que le thymus n'est pas juste important pour la génération de LT mais surtout pour la diversification du répertoire de LT. Malheureusement, cet organe est endommagé par le régime de préparation et la GVHD, menant à une thymopoïèse quasi inexistante. Différentes stratégies ont été mises au point afin d'améliorer la fonction thymique.

Le *keratinocyte growth factor* (KGF) est un membre de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes. Il est connu pour son effet protecteur sur les cellules épithéliales, notamment les cellules épithéliales thymiques. Il a été démontré que l'administration de KGF chez la souris avant la greffe pouvait protéger le thymus contre les dommages induits par la chimiothérapie et ainsi permettre une meilleure reconstitution immunitaire thymique (Min et al., 2002; Panoskaltis-Mortari et al., 2000; Rossi et al., 2002). Malheureusement les essais cliniques chez l'humain n'ont pas démontré d'effets similaires (Langner et al., 2008; Levine et al., 2008).



La perte progressive de la fonction thymique coïncide avec l'augmentation des hormones sexuelles. Il a donc été proposé que l'inhibition de ces hormones pourrait permettre la restauration de la thymopoïèse. Une étude clinique a en effet démontré une augmentation significative de la survie des patients ayant reçu une transplantation autologue (Sutherland et al., 2008). Malheureusement, la régénération thymique n'était pas augmentée par rapport aux sujets contrôles et cette stratégie n'était pas efficace dans un contexte allogénique.

L'absence d'hormone de croissance chez la souris entraîne une atrophie thymique réversible avec un traitement de substitution (Murphy et al., 1992). Il a par ailleurs été démontré que le traitement de souris avec une hormone de croissance humaine recombinante (rhGH) suite à une ASCT augmentait le nombre de thymocytes (Chen et al., 2003). Chez des patients infectés par le VIH, l'utilisation de rhGH augmente la fonction thymique et la réponse immunitaire (Napolitano et al., 2008) et l'étude de ce traitement chez des patients greffés est en ce moment en phase 1.

Plusieurs cytokines sont reconnues pour leur rôle crucial dans la génération et l'homéostasie des cellules du système immunitaire. L'interleukine-2, l'IL-7 et l'IL-15 ont d'ailleurs fait l'objet de nombreuses études en lien avec la reconstitution immunitaire post-greffe (van den Brink et al., 2004).

Dans un contexte de greffe autologue, l'interleukine-2, à faible dose, semble accroître la reconstitution des cellules NK, mais sans effets sur les LT (Soiffer et al., 1992). Ainsi, l'IL-2 pourrait augmenter l'effet anti-tumoral (Soiffer et al., 1994). Malheureusement, des doses trop élevées entraînent de la toxicité et l'IL-2 pourrait aggraver la GVHD dans un contexte allogénique (MacMillan et al., 2003).

L'interleukine-15 semble pour sa part être moins toxique que l'IL-2 et pourrait aussi, par le biais de son action sur les cellules NK, augmenter la réponse antitumorale (Katsanis et al., 1996; Lin et al., 2006). Récemment, il a été démontré que l'IL-15 peut accroître la reconstitution immunitaire, principalement les LT CD8<sup>+</sup>, cellules NK et NKT dans un contexte d'ASCT dépourvue de LT (Alpdogan et al., 2005). Malheureusement, l'effet semble être limité aux LT CD8<sup>+</sup> mémoires et le traitement augmente la gravité de la GVHD dans un contexte CMH-incompatible ou CMH-compatible dans lequel on réintroduit des LT (Blaser et al., 2005).

Dans le même ordre d'idée, l'injection de Flt3-L pourrait améliorer la reconstitution des LT, lymphocytes B et DC post-greffe (Blazar et al., 2001; Buza-Vidas et al., 2007; Fry et al., 2004). Cependant, comme pour l'IL-15, cette cytokine semble accroître la GVHD plutôt que la diminuer dans un contexte allogénique (Blazar et al., 2001).

Connaissant son rôle clé dans la génération et l'homéostasie des LT, l'administration d'IL-7 pourrait aussi être intéressante surtout pour son effet sur le développement et la survie des LTn. Chez l'humain, l'IL-7 recombinante augmente le nombre de LT dans un contexte d'ASCT dépourvue en LT (greffe pour laquelle on a éliminé l'entière des LT afin d'éviter le développement d'une GVHD) mais son effet est principalement sur les T<sub>EM</sub> et quasi inexistant sur les LTn ou T<sub>CM</sub>. De plus, les chercheurs n'ont pas observé d'augmentation du nombre de TREC ou des émigrants thymiques récents (RTE) dans le thymus, concluant que l'IL-7 joue principalement sur l'homéostasie des T<sub>EM</sub> en périphérie (Perales et al., 2012).

Chez la souris, Broers et ses collègues ont démontré, dans un contexte de transplantation syngénique, que l'administration d'IL-7 post-greffe augmentait principalement le nombre de LT matures en périphérie et moindrement celle des RTE (Broers et al., 2003). Alpdogan et ses collègues sont arrivés aux mêmes résultats dans un modèle de transplantation allogénique dépourvu de LT (Alpdogan et al., 2003). Par contre, le traitement à l'IL-7 après transplantation allogénique dans laquelle on réintroduit des LT ne semble efficace que sur les LTm et pourrait aggraver la GVHD (Alpdogan et al., 2001; Chung et al., 2008; Sinha et al., 2002).

### **3.6.3.2. Transfert de cellules compétentes**

Comme nous l'avons vu, le potentiel des traitements *in vivo* pour reconstituer le système immunitaire semble être limité, surtout dans un contexte de transplantation allogénique où les risques d'accroître la gravité de la GVHD sont bien présents. Pour contourner ce problème, plusieurs groupes se sont tournés vers le transfert adoptif de cellules générées *ex vivo*.

Les premiers transferts adoptifs de cellules impliquent le simple transfert de LT du donneur après la greffe (*Donor Lymphocyte Infusion*, DLI). Ce DLI contient des LT antiviraux, permettant une certaine protection antivirale (Hromas et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994)

mais également des LT antitumoraux (Collins et al., 1997). Malheureusement, on observe également dans cette population des clones alloréactifs, pouvant induire une GVHD (Or et al., 2006; Scarisbrick et al., 2015). Une des approches pour remédier à ce problème est l'utilisation de LT génétiquement modifiés dans lesquels on a inséré un gène suicide, permettant de contrôler le développement de la GVHD. Brièvement, les lymphocytes T du donneur sont transduits avec un virus dans lequel un vecteur code pour un gène induisant la mort cellulaire, ce dernier étant seulement exprimé lorsque l'on met les cellules en contacts avec une certaine drogue. Dans une étude de phase I/II, cette approche a permis d'éliminer les lymphocytes T du donneur et ainsi contrôler la GVHD (Markt et al., 2003; Maury et al., 2014).

Il existe aussi une méthode visant à générer *ex vivo* des LTm ou effecteurs virus-spécifiques à partir de LTn du donneur (Gerdemann et al., 2013; Heslop et al., 2010; Sili et al., 2012). Cette méthode permet de protéger le patient contre les infections opportunistes et de faciliter la reconstitution d'un système immunitaire compétent après la greffe (Leen et al., 2009; Rauser et al., 2004; Walter et al., 1995).

Bien que le transfert de LT virus-spécifiques ait du succès, l'équivalent en générant des LT antitumoraux *ex vivo* ne semble pas aussi évident et s'accompagne de plusieurs obstacles comme l'isolation de ces LT, leur migration au site tumoral, leur maintien à long terme et leur fonction cytotoxique dans un milieu immunosuppresseur (Berger et al., 2009). Une nouvelle approche consistant à immuniser le donneur avec des antigènes tumoraux, puis à isoler et transférer au receveur les LT mémoires/effecteurs générés, a eu du succès chez la souris, mais reste difficilement applicable chez l'humain dû à la difficulté d'isoler des antigènes tumoraux spécifiques (Kohrt et al., 2011; Li et al., 2011b). Finalement, l'utilisation de LT génétiquement modifiés dans lesquels on remplace le TCR par un récepteur spécifique à un antigène tumoral est également très prometteuse (Kershaw et al., 2013).

## 4. Hypothèse et objectifs

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques est employée pour traiter une multitude de cancers hématopoïétiques mais est également utilisée pour traiter des maladies génétiques, auto-immunes et des tumeurs solides. Malheureusement, l'effet bénéfique de cette technique est limité par la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) qui demeure la cause principale de mortalité post-greffe. La GVHD endommage différents organes et retarde la reconstitution immunitaire des LT ce qui augmente les risques d'infection et de rechute. Suite à l'ASCT, la prolifération homéostatique est la voie principale de reconstitution des LT. Comprendre les mécanismes responsables de cette immunosuppression permettrait de développer de nouvelles thérapies et ainsi augmenter les chances de survie des patients greffés. Nous émettons l'hypothèse que :

**La GVHD affecte la régénération des composantes de la niche périphérique nécessaires à la prolifération homéostatique des lymphocytes T**

Les objectifs généraux de cette thèse sont :

1. Comprendre comment la GVHD affecte la reconstitution des lymphocytes T naïfs après une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques
2. Mettre en place une thérapie de reconstitution immunitaire après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques

## Chapitre 2: Article 1

### **SDF-1 $\alpha$ and IL-7 treatment improves homeostatic proliferation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells after allogeneic stem cell transplantation**

Simon-David Gauthier, Dominique Leboeuf, Renaud Manuguerra-Gagné, Louis Gaboury and Martin Guimond

Cet article a été accepté dans le journal *Biology of Blood and Marrow Transplantation* en juin 2015.

**SDF-1 $\alpha$  and IL-7 treatment improves homeostatic proliferation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells after allogeneic stem cell transplantation**

Simon-David Gauthier<sup>1,2</sup>, Dominique Leboeuf<sup>1</sup>, Renaud Manuguerra-Gagné<sup>1</sup>, Louis Gaboury<sup>3</sup> and Martin Guimond<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montréal, QC, Canada, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada and <sup>3</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer, Montréal, QC, Canada.

Running Title: Low DCs and IL-7 constrain CD4 HP during GVHD

Correspondence should be addressed to

Dr. Martin Guimond,

Assistant Professor, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Department of Hematology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, 5415 Boulevard de l'Assomption, Montréal, H1T 2M4.

Key words: GVHD, Homeostatic Proliferation, CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes, Dendritic Cells, Flt3-L, IL-7, SDF-1 $\alpha$ .

## ABSTRACT

Graft-versus-host disease (GVHD) impairs immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) and effective therapies aimed at restoring T cell counts in GVHD patients have yet to be developed. During GVHD, CD4<sup>+</sup> T cell reconstitution is particularly affected and current models hold that GVHD insult to the peripheral lymphoid niche is responsible for this effect. Here we show that naïve CD4<sup>+</sup> T cell homeostatic proliferation (HP) is lost during GVHD due to low systemic interleukin-7 (IL-7) and impaired dendritic cell (DC) regeneration. We assessed factors involved in DC differentiation and found that, while Flt3-Ligand (Flt3-L) levels were normal, Stromal Derived Factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) was diminished in the blood of GVHD mice. Unlike Flt3-L treatment, the administration of SDF-1 $\alpha$  specifically increased CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC numbers and did not worsen GVHD. Importantly, CD4<sup>+</sup> T cell HP was enhanced only when IL-7 and SDF-1 $\alpha$  or Flt3L were co-administered, confirming the crucial role of DCs and IL-7 in restoring CD4<sup>+</sup> T cell regeneration during GVHD. Altogether, our results indicate that CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs are part of the peripheral niche that controls CD4<sup>+</sup> T cell HP and that their depletion, combined with low systemic IL-7, explains how GVHD constrains naïve CD4<sup>+</sup> T cell reconstitution after allo-SCT.

## INTRODUCTION

Graft-versus-host disease (GVHD) is the principal complication of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) and occurs when alloreactive donor T cells recognize differences in major and/or minor histocompatibility antigens expressed by recipient cells (1). Despite significant progress in clinical management of acute GVHD, its incidence following allo-SCT is important and patients normally experience chronic lymphopenia. Early after allo-SCT, the inflammatory milieu presents a fertile ground for alloreactivity and thymic insult resulting from GVHD is largely responsible for thymic dysfunction and immune-incompetence (2-4). During this period, peripheral mechanisms that regulate homeostatic proliferation (HP) become essential in order to restore immunocompetence to the greatest extent (5, 6).

Studies in mice and humans have demonstrated that T cell receptor (TCR) stimulation and IL-7 signaling are both essential for the maintenance and homeostatic cycling (HC) of naïve T cells in the periphery (7-9). Following post-natal T cell depletion, increased availability of IL-7 and self-peptide-MHC complexes contribute to induce HP (10-13). However, HP of naïve CD4<sup>+</sup> T cells is inefficient compared to naïve CD8<sup>+</sup> T cells and normally results in chronic CD4 lymphopenia (6). IL-7 is currently used in clinical trials to increase T cell counts in lymphopenic patients but early results demonstrate a greater benefit on naïve CD8<sup>+</sup> compared to naïve CD4<sup>+</sup> T cells (14, 15). TCR signalling is a major controlling factor for IL-7 responsiveness of CD4 HP and *in vivo* modulation of dendritic cells (DCs) by Flt3-Ligand (Flt3-L) can substantially enhance HP of naïve T cells (16-18). Recent studies have also indicated that Stromal-Derived Factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) is important for DC homeostasis but its mechanism of action remains largely unknown. SDF-1 $\alpha$  is a



chemoattractive cytokine essential for the homing and the retention of hematopoietic stem cells (HSCs) inside the bone marrow (BM) (19). Studies have demonstrated that disruption of the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis constrains B cell lymphopoiesis and affects plasmacytoid dendritic cell (pDC) differentiation and perhaps other DC subsets (20, 21). Thus, in addition to IL-7, DC homeostasis is likely to have a substantial effect on the degree of CD4 HP after allo-SCT.

Recent insights into the biology of GVHD have demonstrated that insults to the peripheral niche regulating T cell homeostasis is perhaps the most important factor limiting T cell regeneration following allo-SCT (22, 23). While IL-7 levels are normally high during lymphopenia (11, 12, 17), studies have demonstrated that the rise in systemic IL-7 following allo-SCT is of short duration and rapidly returns to lower levels despite an incomplete immune reconstitution (24, 25). Moreover, it has been suggested that pDC maturation is affected by GVHD and similarly to B cell lymphopoiesis, insults to the BM microenvironment could account for this effect (26-28). Altogether, these findings support a model wherein some elements of the peripheral niche required for CD4 homeostatic expansion are dysfunctional during GVHD. This study was conducted to evaluate the adverse effect of GVHD on DCs and IL-7 and how these changes constrain CD4<sup>+</sup> T cells HP.

## MATERIALS AND METHODS

*Mice and administration of IL-7, Flt3-L and SDF-1 $\alpha$ .* Female C57BL/6.SJL (B6.SJL; H-2<sup>b</sup>, Ptpre<sup>a</sup> Pep3<sup>b</sup>, CD45.1<sup>+</sup>), C57BL/6.129S7-Rag1<sup>tmMom/J</sup> (Rag<sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) and (C57BL/6 X DBA2/J) F<sub>1</sub> (B6D2F<sub>1</sub>; H-2<sup>b/d</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Female C57BL/6.129S7-IL-7<sup>tm1lmx/J</sup> (IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) and anti-HY CD4<sup>+</sup> T cell (Marilyn) mice were provided by Dr. Olivier Lantz (Institut Curie). IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup>.CD11cDTR mice were generated at the animal facility by breeding IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice with CD11cDTR mice purchased from The Jackson Laboratory. All animals were housed at the Maisonneuve-Rosemont hospital animal facility and animal studies were performed in accordance with the Maisonneuve-Rosemont hospital animal care committee. Recombinant human IL-7 (rhIL-7) was supplied by Cytheris Inc. Vehicle (phosphate buffer saline; PBS) or rhIL-7 (10 $\mu$ g) was administered to mice for 7 days as a daily intraperitoneal (i.p.) injection. Recombinant human Flt3-L and SDF-1 $\alpha$  were purchased from BioXcell and PeproTech respectively, and administered daily to mice as an i.p. injection of 10 $\mu$ g for 14 days.

*Stem cell transplantation and GVHD.* We used a “parent into F<sub>1</sub>” mouse model (B6 $\rightarrow$ B6D2F<sub>1</sub>) for allogeneic HSC stem cell transplantation using B6 mice as donors and B6D2F<sub>1</sub> mice as recipients. On day 0, 1x10<sup>7</sup> BM cells from either B6.IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> or B6.Rag<sup>-/-</sup> donor mice (H-2<sup>b</sup>) were injected intravenously into lethally irradiated (10Gy) B6D2F<sub>1</sub> recipients (H-2<sup>b/d</sup>) along with 1x10<sup>6</sup> purified T cells (T cell enrichment kit, StemCell Technologies) from B6.SJL mice (GVHD-causing T cells) or B6D2F<sub>1</sub> mice (syngeneic T cells, no GVHD). Mice were weighed every 3 days and monitored for clinical signs of GVHD. A weight loss of 20% beyond day 14 after transplantation or signs of

distress (immobility, arched back, blepharospasm) were considered survival end-points entailing euthanasia. For the generation of donor-derived DCs, B6D2F<sub>1</sub> recipient mice received intravenously  $1 \times 10^7$  BM cells from B6.*Rag*<sup>-/-</sup> donor mice. Six weeks later, hematopoietic cells of chimeric mice were considered fully regenerated.

*CTV staining and adoptive transfer of lymphocytes.* Spleen and LN from female Marilyn mice were homogenized and lymphocytes enriched by negative selection (T cell enrichment kit, StemCell Technologies). Enriched T cells were suspended at  $1 \times 10^7$  cells/ml in PBS and incubated for 15 min at room temperature with 1  $\mu$ l/ml of 5  $\mu$ M CTV (Cell Trace Violet, Invitrogen). Cells were washed twice in PBS and recipient mice received  $1 \times 10^6$  CTV-labeled T cells by i.v. injection. After 7 days, mice were sacrificed and T cells in the spleen were analyzed for CTV content was analyzed with a LSRII flow cytometer (BD Bioscience). FlowJo software (TreeStar) was used for all analysis.

*DC generation in vitro.* BM cells were flushed from both femurs and tibias and  $6 \times 10^6$  cells ( $1 \times 10^6$ /well, 6 wells plate) were cultured for 7 days in complete RPMI medium (RPMI + 10% FBS + 10mM HEPES + 1% Pen/Strep + 0.1 mM non-essential amino acids + 50 $\mu$ M 2-mercaptoethanol + 1mM Sodium Pyruvate + 1% L-glutamate) supplemented with 200ng/ml of Flt3-L.

*Histopathological scoring and microscopy.* Tissues prepared for histology were fixed in buffered 10% formalin immediately after sampling, embedded in paraffin, cut in 5 $\mu$ m sections, and stained with hematoxylin and eosin according to standard methods. Pictures from tissue sections were

taken at room temperature using an AxioCamMR3 camera mounted on an AxioImager Z2 microscope and analyzed using the AxioVision software (Carl Zeiss). Images were acquired using a 10X/0.3 numerical aperture objective. Histopathological scoring on transplanted animals was done by a pathologist in a blinded-fashion on paraffin-embedded colon, spleen and BM slides (see Supplemental Table I for scoring).

*Flow cytometry.* Cells were resuspended at a density of  $1 \times 10^7$  cells/ml in FACS buffer and were incubated 30 min on ice with diluted monoclonal antibodies and then washed and resuspended in FACS buffer for immediate analysis. The following monoclonal antibodies were used from BD Bioscience: PE-anti-V $\beta$ 6 (RR4-7), PerCPCy5.5-anti-Lineage cocktail; from BioLegend : PeCy7-anti-CD4 (GK1.5); PeCy7-anti-CD8 (53-2.7); PerCPCy5.5-anti-CD45.1 (A20); FITC-anti-CD8 (5H10-1); PE-anti-CD11c (N418); PerCPCy5.5-anti-CD11b (M1/70); FITC-anti-B220 (RA3-6B2); FITC-anti-TCR $\beta$  (H57-597), APC-anti-H2-K<sup>d</sup> (SF1-1.1), PeCy7-anti-CD117 (2B8), APCCy7-anti-Sca-1 (D7), FITC-anti-CD16/32 (93); from eBioscience: APC-anti-CD127 (A7R34), PE-anti-CD135 (A2F10), APC-anti-CD115 (AFS98); from Miltenyi Biotec: APC-Anti-PDCA-1 (JF05-1C2.4.1).

*In vivo cytotoxicity assay and T cell depletion.* Spleens from B6, B6D2F<sub>1</sub> and B6 $\rightarrow$ B6D2F<sub>1</sub> chimeric mice were homogenized and DCs were isolated with the CD11c Positive Selection Kit (StemCell Technologies). CD11c positive cells were stained with 5  $\mu$ M CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester; Molecular Probes) or 5  $\mu$ M CTV and resuspended with PBS at  $1 \times 10^6$  cells/ml at a ratio of 1:1 prior to be injected intravenously into mice as specified. Thirty-six hours later, mice were sacrificed and stained cells from the spleen were analysed by

flow cytometry. Absolute number of DCs was determined by gating on CD11c<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> or CD11c<sup>+</sup>CTV<sup>+</sup> cells. For T cell depletion, transplanted mice were treated with 500µg of anti-CD4 (GK1.5) and anti-CD8 (2.43) at days +28 and +30 during GVHD, following allo-SCT.

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).* Briefly, plasma was isolated at day +35 post-SCT by intracardiac puncture of anaesthetised mice and Flt3-L and SDF-1α levels were measured in 100µl of plasma diluted 1:1 with reagent according to the manufacturer's protocol (R&D Systems).

*Stromal cell isolation and quantitative real-time PCR.* BM from both femurs and tibias was flushed and bones were cut into little pieces and digested in dispase (0,1%, Gibco) + type 1 collagenase (0,25%, Sigma) for 30 min at 37°C. Stromal cells were then filtered through a 70µm cell strainer and washed with complete RPMI buffer (2% FBS, 1% Pen-Step). RNA was prepared from stromal and BM cells using Trizol. Expression of IL-7, Flt3-L and SDF-1α mRNA was measured with an ABI-Prism 7500 Sequence Detection system. RNA expression for each sample was normalized to the expression of the housekeeping gene *Gapdh* (encoding glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase). Samples were run in triplicates and RNA expression was determined using standard curve method.

*Statistical analysis.* Prism 5.0 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier estimates and compared by log-rank analysis. Mann Whitney was used to compare pairs of data, and Kruskal-Wallis with Dunn's post-test was used to

compare 3 or more groups. The specific tests used are described in the figure legends. A p-value less than or equal to 0.05 was considered significant. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m.

## RESULTS

### GVHD constrains CD4 homeostatic proliferation

GVHD insult to the peripheral niche has been shown to limit thymic independent T cell regeneration but which factor(s) is/are affected by GVHD remains unknown (22, 23, 27). Dendritic cells and IL-7 are both essential for naïve T cells and accessibility to these factors could diminish survival and HP of T cells during GVHD. Evaluation of HP in GVHD hosts is difficult because it can be confounded with proliferation resulting from T cell activation. Furthermore, HP of naïve CD4<sup>+</sup> T cells is typically inefficient during lymphopenia which further complicates its evaluation during GVHD (Supplemental Fig. 1A). We have previously shown that HP of CD4<sup>+</sup> T cells is augmented in IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice (17) and to amplify CD4<sup>+</sup> HP during lymphopenia, we transplanted female B6D2F<sub>1</sub> recipients with BM from female B6.IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice. To induce GVHD, we added normal allogeneic female B6 T cells in the graft (Fig. 1A).

To ensure that GVHD severity was not affected by lack of IL-7R $\alpha$  on hematopoietic cells, we compared GVHD in female B6D2F<sub>1</sub> mice grafted with BM cells from female B6.IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> or B6.Rag<sup>-/-</sup> (i.e. IL-7R $\alpha$ <sup>+/+</sup>) mice. We found that both GVHD groups experienced similar weight loss and shorter survival time compared to mice receiving B6.IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> BM and syngeneic B6D2F<sub>1</sub> T lymphocytes (SYN) (Fig. 1B and C). We then analyzed in a blinded fashion histopathology characteristics of acute GVHD at day +35 post-SCT and found equivalent alloreactive T cell

infiltration in the gut with evidence of enteritis in both GVHD groups (Supplemental Fig. 1B). T cell counts were also similar between GVHD groups and significantly lower compared to non-GVHD mice (Fig. 1D and supplemental Fig. 1C-D). Together, our data demonstrates that lack of IL-7R $\alpha$  on hematopoietic cells does not significantly impact the severity of GVHD in this model.

The functionality of the peripheral niche was then evaluated by transferring CTV-labeled non-alloreactive naïve anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells (Marilyn) into GVHD or non-GVHD hosts and assessing their HP (CTV dilution) 7 days later (Fig. 1A). It is important to stress that Marilyn T cells used to evaluate the functionality of the peripheral niche in GVHD mice cannot undergo T cell activation since they are specific to the HY male antigen which is absent in our transplantation model (donors and recipients are female). In addition, Marilyn T cells cannot elicit reactivity from B6D2F<sub>1</sub> T cells as they are derived from the C57BL/6 background (cells from B6D2F<sub>1</sub> mice which express the H-2<sup>b/d</sup> haplotype are tolerant to Marilyn cells expressing H-2<sup>b</sup>). Thus, the use of females as donors and recipients insured that proliferation of Marilyn cells would result from HP and not T cell activation (17). While controls transplanted with IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> BM cells and syngeneic B6D2F<sub>1</sub> T cells efficiently supported CD4 HP, proliferation of Marilyn T cells was completely lost in GVHD hosts (Fig. 1E). Absence of HP was associated with diminished recovery of anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen (Fig. 1F). Finally, Marilyn T cells that failed to undergo HP in GVHD animals could undergo HP upon transfer into secondary non irradiated IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> female recipients, confirming that GVHD insults to the peripheral niche is largely responsible for lack of HP after allo-SCT (Fig. 1E, upper histogram).

### **Impaired DC reconstitution and low IL-7 levels constrain CD4 HP during GVHD**

Post-thymic survival of naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes depends on ongoing stimulation between the TCR and self-peptide-MHCII complexes provided by DCs and a second signal mediated by IL-7. While the regeneration of donor derived CD11c<sup>+</sup> cells occurred efficiently in non-GVHD mice (full chimerism by day +28 post-ASCT, data not shown), fewer DCs were found in GVHD hosts (Fig. 2A, B). Specifically, we found a significant reduction in CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs as well as plasmacytoid DCs (pDCs). We excluded again a potential effect of the absence of IL-7 signalling on DC immune reconstitution by repeating the same experiment with B6.Rag<sup>-/-</sup> and wild type B6 BM and obtaining similar results (Fig. 2A and Supplemental Fig. 1E-G). Finally, we depleted CD11c<sup>+</sup> DCs in IL-7Rα<sup>-/-</sup>CD11cDTR→B6D2F<sub>1</sub> mice to confirm the essential role of CD11c<sup>+</sup> cells in CD4 HP (Fig. 2C).

We also examined IL-7 transcripts in BM and spleen stromal cells and found diminished expression in GVHD mice compared to non-GVHD hosts (Fig. 2D). Given that elevated systemic IL-7 can signal stromal cells and induce IL-7 mRNA down-modulation, we used an *in vivo* bioassay based on IL-7 mediated down-regulation of IL-7Rα on T cells to confirm diminished systemic IL-7 in GVHD mice. Congenic anti-HY CD4<sup>+</sup> T lymphocytes transferred into GVHD animals had much higher surface expression of IL-7Rα than lymphocytes transferred into non-GVHD hosts, confirming low IL-7 levels in GVHD mice despite profound lymphopenia (Fig. 2E). Together, our results support a model wherein the absence of DCs combined with diminished systemic IL-7 contribute to impair HP of naïve CD4<sup>+</sup> T cells during GVHD.



### **Allorecognition and myelosuppression constrain DC regeneration during GVHD**

The significant reduction in donor-derived DC content during GVHD could relate to their elimination by GVHD-causing T cells or, like B lymphocytes, could result from diminished production from HSCs (27). We first evaluated the potential killing of mature DCs by alloreactive T cells using an *in vivo* cytotoxicity assay in which we compared the elimination of donor-derived DC<sup>B6→B6D2F1</sup> and recipient B6D2F1 DCs to control B6 DCs after adoptive transfer into GVHD and non-GVHD hosts (Fig. 3A). B6 DCs were used to eliminate the possibility of non-specific bystander killing since GVHD-causing T cells are normally tolerant to these cells. As predicted, fewer B6D2F1 DCs were recovered from GVHD hosts compared to control B6 DCs, confirming the recognition and elimination of recipient DCs by GVHD-causing T cells (Fig. 3B, upper panels). As for B6D2F1 DCs, less donor-derived DC<sup>B6→B6D2F1</sup> were recovered from GVHD mice, confirming the elimination of donor-derived DCs by GVHD-causing T cells as well (Fig. 3B, lower panels).

The finding that alloreactive T cells have the potential to eliminate mature DCs raised the prospect that T cell depletion could improve DC recovery in GVHD hosts. We thus proceeded to deplete T cells during GVHD, i.e 28 days post-allo-SCT (Supplemental Fig. 1H), and then monitored DC recovery 2 months after. While T cell depletion had no impact on the number of DCs in control mice, we observed a small but non-significant increase in CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs in T cell-depleted GVHD animals (Fig. 3C). Together, our data support a model wherein donor-derived DCs can be eliminated by alloreactive T cells but this mechanism is not the dominant factor limiting DC regeneration during GVHD.

### **Systemic SDF-1 $\alpha$ but not Flt3-L is diminished in GVHD hosts**

Since T cell depletion did not lead to a substantial increase in DCs, we postulated that the diminution of donor-derived DCs in GVHD mice could relate to an absence of DC progenitors or an incapacity of these cells to differentiate into mature DCs. As previously shown, the cellularity of the BM was significantly diminished, suggesting a global myelosuppression in GVHD mice (Supplemental Fig. 2A). We then studied common DC progenitors (CDP) and found fewer of these cells in GVHD mice compared to non-GVHD hosts (Fig. 4A). Consistent with the diminished number of CDP *in vivo*, fewer DCs were generated from BM cells of GVHD mice when cultured with Flt3-L (Fig. 4B). The role of Flt3-L is well-known in DC development and given its action on DC progenitors, we originally postulated that Flt3-L production could be compromised during GVHD. Surprisingly however, despite a significant reduction in Flt3-L transcripts in BM and spleen stromal cells, Flt3-L levels were normal in the blood of GVHD mice, indicating that low systemic Flt3-L is probably not the limiting factor that constrains DC regeneration during GVHD (Fig. 4C-D). We also looked at Flt3 receptor gene expression on Lin<sup>-</sup> BM cells and found diminished mRNA expression, probably because CDPs are themselves reduced (Fig. 4E).

Recent *in vivo* studies have indicated a critical role played by the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis in DC development (20). SDF-1 $\alpha$  is produced in part by stromal cells of the BM and plays a critical role in homing, maintenance and survival of stem cells within the BM (19, 29-31). RT-PCR analysis of SDF-1 $\alpha$  transcripts showed diminished gene expression in BM and spleen stromal cells while the expression of CXCR4 on Lin<sup>-</sup> BM cells remained unaffected by GVHD (Fig. 4F-G). Most importantly, we found diminished systemic SDF-1 $\alpha$  in the blood of GVHD mice, raising the

prospect that SDF-1 $\alpha$  is perhaps the limiting factor that hampers DC regeneration during GVHD (Fig. 4H).

### **Flt3-L and SDF-1 $\alpha$ can increase DC numbers in GVHD mice and improve CD4 HP when combined with IL-7 therapy**

It is well known that Flt3-L treatment can significantly increase DC numbers in mice (32) and humans (33) but the capacity of SDF-1 $\alpha$  to modulate DC content after allo-SCT has never been evaluated (34-36). We administered Flt3-L to GVHD mice and observed a significant increase in conventional CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs as well as pDCs (Fig. 5A, B and supplemental figure 3). We repeated the same experiment by administering SDF-1 $\alpha$  to GVHD mice and found a significant increase in CD11c<sup>+</sup> DCs, this time limited to CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs) (Fig. 5C-F and supplemental figure 3). Surprisingly, weight loss and GVHD severity were diminished in SDF-1 $\alpha$  compared to PBS and Flt3-L treated mice (Fig. 5G-H).

To address the functionality of the peripheral niche regenerated by Flt3-L or SDF-1 $\alpha$ , we transferred CTV-labelled anti-HY Marilyn cells into GVHD mice treated with these factors and analyzed their proliferation 7 days later (Fig. 6A). While the administration of Flt3-L or SDF-1 $\alpha$  could not restore naïve CD4 HP in GVHD mice (Fig. 6B, C), their combination to IL-7 (Flt3-L+IL-7 or SDF-1 $\alpha$ +IL-7) could significantly improve naïve CD4 HP (Fig. 6B-D). Importantly, IL-7 alone was insufficient for CD4 HP, confirming the critical role of CD11c<sup>+</sup> DCs in this process. Nonetheless, more anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells were recovered from IL-7 treated mice, indicating that IL-7 can increase T cell survival despite lack of HP (18) (Fig. 6D). Altogether, our data demonstrates that loss of naïve CD4 HP during GVHD relates in part to diminished DCs and low IL-7 levels.

## DISCUSSION

In this study, we identify three key elements at which GVHD impairs thymic independent CD4 immune reconstitution. We first show that HP of non-alloreactive naïve CD4<sup>+</sup> T cells is diminished because DC counts and systemic IL-7 are low in GVHD hosts. Second, GVHD insults induce chronic dysfunction of the BM microenvironment, which limits DC production even after GVHD-causing T cells are removed. Finally, we show that the administration of SDF-1 $\alpha$  can increase DC counts and when administered with IL-7, can improve HP of naïve CD4<sup>+</sup> T cells following allo-SCT.

In humans, studies have demonstrated that DC counts can be diminished during GVHD but the potential impact on CD4 T cell homeostasis has never been fully understood (26, 37). The effects of alloreactivity on DC homeostasis are probably multiple, but here we found that GVHD-causing T cells can eliminate mature DCs and induce damage to the BM microenvironment resulting in impaired DC production from donor HSCs. DCs expressing the relevant MHC-allopeptide complexes represent obvious targets for GVHD-causing T cells and their elimination could limit overwhelming T cell activation (38). Surprisingly, the removal of alloreactive T cells during GVHD failed to restore DC counts which remained below normal levels for several months post-lymphodepletion (Fig. 3C and observation by Gauthier S-D). In addition, the observation that GVHD HSCs undergo normal differentiation into DCs when transferred into non-GVHD hosts is more consistent with chronic damage to the BM microenvironment acting as a key limiting factor for DC regeneration after allo-SCT (data not shown). We cannot however exclude the possibility that donor-derived DCs were eliminated by radioresistant recipient NK cells.

Although factors involved in DC differentiation have not been entirely elucidated, studies have indicated a role for Flt3-L and SDF-1 $\alpha$  in DC homeostasis (39, 40). During GVHD, both transcripts were significantly diminished in the BM but only systemic SDF-1 $\alpha$  was decreased in the blood. Flt3-L can be produced by activated T lymphocytes which could compensate for diminished Flt3-L production by stromal cells (41). Therefore, it seems paradoxical to invoke limiting amounts of Flt3-L to explain the lack of DC regeneration in GVHD hosts, unless systemic Flt3-L is not physiologically accessible to HSCs inside the BM. Interleukin-7 is also essential for CD4 HP and while its level is normally high during lymphopenia (11, 12), we found low IL-7 levels in GVHD mice (Fig. 2D, E). Similar findings were made in transplanted humans and IL-7 consumption by T lymphocytes has been invoked to explain low IL-7 levels (24, 25). Importantly however, it is unlikely that IL-7 consumption by GVHD-causing T cells explains such decrease because most T cells are activated during GVHD and do not express significant IL-7R $\alpha$  on their surface (42). A negative feedback loop on IL-7 producing cells can occur when systemic IL-7 is high enough to signal on stromal cells but we excluded this possibility as low systemic IL-7 combined with diminished IL-7 mRNA production by stromal cells is more consistent with alterations to IL-7 producing cells (Fig. 2C, D). IL-7, Flt3-L and SDF-1 $\alpha$  are all produced by stromal cells and during GVHD, fewer mesenchymal stem cells (MSCs) were recovered from mice (Supplemental Fig. 2B) (43-45). Thus, GVHD insults to stromal elements of primary and secondary lymphoid organs contribute to the impairment of the CD4 peripheral niche.

Approaches to accelerate lymphocyte reconstitution following allo-SCT have demonstrated that the benefit on T cell regeneration is frequently offset by excessive GVHD (46-48). For instance, Flt3-L worsens GVHD probably because most DC subsets are increased by the treatment (Fig. 5

and Supplemental Fig. 3). In contrast, SDF-1 $\alpha$  did not worsen GVHD, perhaps because its effect is restricted to CD8 $\alpha^+$  DC. Interestingly, CD8 $\alpha^+$  DCs have an intrinsic inability to activate CD4 $^+$  T cells and are poor inducers of alloreactivity (49, 50). Such characteristics are perhaps important for preventing unwanted T cell activation during homeostatic stimulation of naïve CD4 $^+$  T cells. Finally, we cannot exclude a potential effect of SDF-1 $\alpha$  on T cells themselves since SDF-1 $\alpha$  signalling can affect their homing, location as well as their function (51, 52). Additional studies are necessary to clarify the mechanism of SDF-1 $\alpha$  and perhaps determine whether this chemokine, or CXCR4 agonists, could be used to improve CD4 regeneration and GVHD after allo-SCT.

Interleukin-7 has also been implicated in GVHD and when administered early after allo-SCT, it can expand anti-host reactive T cell precursors and aggravate GVHD (48, 53, 54). In this work, we initiated IL-7 therapy at day +35 post-allo-SCT, when most T cells are activated and express undetectable levels of IL-7R $\alpha$ , which likely explain why GVHD severity was not affected by IL-7 treatment (not shown). Our data demonstrate that improvement of CD4 HP during GVHD requires not only IL-7 therapy but also the administration of factors regulating DC differentiation and production. Interestingly, in the setting of T cell depleted allo-SCT, IL-7 therapy can improve immune reconstitution of T cells, in part due to partial recovery of thymopoiesis but also because DC immune reconstitution in the periphery is robust (42, 55). Despite our success to induce HP of CD4 HP in GVHD hosts, levels of proliferation remained low compared to non-GVHD controls (Fig. 6B). Such difference perhaps relate to the dosing and administration schedule of SDF-1 $\alpha$ , physiologic IL-7 levels, access of naïve CD4 $^+$  T cells to secondary lymphoid organs and damage to lymphoid organs themselves. Additional studies are needed to establish the optimal therapeutic condition of SDF-1 $\alpha$  for maximal effect on naïve CD4 $^+$  T cell expansion.

In summary, lymphocyte reconstitution represents a major challenge in the field of allo-SCT because immune intervention to accelerate T cell regeneration can worsen GVHD. Our study shows that GVHD induces chronic damage to the BM microenvironment which in turn impairs the regeneration of the lymphoid niche that regulates peripheral CD4 homeostasis. This study also implicates SDF-1 $\alpha$  as a key regulator of CD8 $\alpha^+$  DCs and identifies this subset as part of the peripheral niche controlling CD4 HP. Finally, we propose that future therapies aimed at restoring CD4 $^+$  T cell counts in GVHD hosts should include, in addition to IL-7, SDF-1 $\alpha$  or CXCR4 agonist to promote the regeneration of DC subset(s) involved in the homeostasis of CD4 $^+$  T cells.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Mrs Catherine Mauger for mice husbandry. We also thank Cytheris for providing rhIL-7 and Drs. Salix Boulet, Nathalie Labrecque and Crystal Mackall for reviewing the manuscript. This work was supported by grants from the Cancer Research Society of Canada and in part by the Canadian Institutes of Health Research to M.G; S-D.G. received a scholarship from The Cole Foundation and the Fonds de Recherche du Québec - Santé.

## **AUTHORSHIP**

S-D.G. did all of the experiments, designed the experiments and wrote the manuscript; D.L. did experiments, provided intellectual input and contributed to the writing of the manuscript. R.M-G provided technical input for MSC cultures. L.G. evaluated and scored GVHD histopathology.

M.G. provided intellectual input and research support and wrote the manuscript. The authors declare that they have no competing interests.



## REFERENCES

1. Ferrara, J. L., and H. J. Deeg. 1991. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324: 667-674.
2. Seddik, M., T. A. Seemayer, and W. S. Lapp. 1984. The graft-versus-host reaction and immune function. II. Recruitment of pre-T-cells in vivo by graft-versus-host-induced dysplastic thymuses following irradiation and bone marrow treatment. *Transplantation* 37: 286-290.
3. Muller-Hermelink, H. K., G. E. Sale, B. Borisch, and R. Storb. 1987. Pathology of the thymus after allogeneic bone marrow transplantation in man. A histologic immunohistochemical study of 36 patients. *Am J Pathol* 129: 242-256.
4. Bleyer, W. A., R. M. Blaese, J. S. Bujak, G. P. Herzig, and R. G. Graw, Jr. 1975. Long-term remission from acute myelogenous leukemia after bone marrow transplantation and recovery from acute graft-versus-host reaction and prolonged immunoincompetence. *Blood* 45: 171-181.
5. Storek, J., R. P. Witherspoon, and R. Storb. 1995. 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.
6. Mackall, C. L., T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, I. T. Magrath, L. H. Wexler, D. S. Dimitrov, and R. E. Gress. 1997. Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89: 3700-3707.
7. Nakajima, H., E. W. Shores, M. Noguchi, and W. J. Leonard. 1997. The common cytokine receptor gamma chain plays an essential role in regulating lymphoid homeostasis. *J Exp Med* 185: 189-195.
8. Soares, M. V., N. J. Borthwick, M. K. Maini, G. Janosy, M. Salmon, and A. N. Akbar. 1998. IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA+ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J Immunol* 161: 5909-5917.
9. Labrecque, N., L. S. Whitfield, R. Obst, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 2001. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15: 71-82.
10. Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11: 183-190.

11. Napolitano, L. A., R. M. Grant, S. G. Deeks, D. Schmidt, S. C. De Rosa, L. A. Herzenberg, B. G. Herndier, J. Andersson, and J. M. McCune. 2001. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 7: 73-79.
12. Fry, T. J., E. Connick, J. Falloon, M. M. Lederman, D. J. Liewehr, J. Spritzler, S. M. Steinberg, L. V. Wood, R. Yarchoan, J. Zuckerman, A. Landay, and C. L. Mackall. 2001. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood* 97: 2983-2990.
13. Tan, J. T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K. I. Weinberg, and C. D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8732-8737.
14. Rosenberg, S. A., C. Sportes, M. Ahmadzadeh, T. J. Fry, L. T. Ngo, S. L. Schwarz, M. Stetler-Stevenson, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, M. Morre, R. Buffet, C. L. Mackall, and R. E. Gress. 2006. IL-7 administration to humans leads to expansion of CD8+ and CD4+ cells but a relative decrease of CD4+ T-regulatory cells. *J Immunother* 29: 313-319.
15. Sportes, C., F. T. Hakim, S. A. Memon, H. Zhang, K. S. Chua, M. R. Brown, T. A. Fleisher, M. C. Krumlauf, R. R. Babb, C. K. Chow, T. J. Fry, J. Engels, R. Buffet, M. Morre, R. J. Amato, D. J. Venzon, R. Korngold, A. Pecora, R. E. Gress, and C. L. Mackall. 2008. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *J Exp Med* 205: 1701-1714.
16. Fry, T. J., M. Sinha, M. Milliron, Y. W. Chu, V. Kapoor, R. E. Gress, E. Thomas, and C. L. Mackall. 2004. Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood* 104: 2794-2800.
17. Guimond, M., R. G. Veenstra, D. J. Grindler, H. Zhang, Y. Cui, R. D. Murphy, S. Y. Kim, R. Na, L. Hennighausen, S. Kurtulus, B. Erman, P. Matzinger, M. S. Merchant, and C. L. Mackall. 2009. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 10: 149-157.
18. Hennion-Tscheltzoff, O., D. Leboeuf, S. D. Gauthier, M. Dupuis, B. Assouline, A. Gregoire, S. Thiant, and M. Guimond. 2013. TCR triggering modulates the responsiveness and homeostatic proliferation of CD4+ thymic emigrants to IL-7 therapy. *Blood* 121: 4684-4693.
19. Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977-988.
20. Kohara, H., Y. Omatsu, T. Sugiyama, M. Noda, N. Fujii, and T. Nagasawa. 2007. Development of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling. *Blood* 110: 4153-4160.

21. Greenbaum, A., Y. M. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettpelz, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa, and D. C. Link. 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495: 227-230.
22. Dulude, G., D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med* 189: 1329-1342.
23. Gorski, J., X. Chen, M. Gendelman, M. Yassai, A. Krueger, E. Tivol, B. Logan, R. Komorowski, S. Vodanovic-Jankovic, and W. R. Drobyski. 2007. Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood* 109: 5502-5510.
24. Dean, R. M., T. Fry, C. Mackall, S. M. Steinberg, F. Hakim, D. Fowler, J. Odom, J. Foley, R. Gress, and M. R. Bishop. 2008. Association of serum interleukin-7 levels with the development of acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 26: 5735-5741.
25. Thiant, S., I. Yakoub-Agha, L. Magro, J. Trauet, V. Coiteux, J. P. Jouet, J. P. Dessaint, and M. Labalette. 2010. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 45: 1546-1552.
26. Banovic, T., K. A. Markey, R. D. Kuns, S. D. Olver, N. C. Raffelt, A. L. Don, M. A. Degli-Esposti, C. R. Engwerda, K. P. MacDonald, and G. R. Hill. 2009. Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 182: 912-920.
27. Shono, Y., S. Ueha, Y. Wang, J. Abe, M. Kurachi, Y. Matsuno, T. Sugiyama, T. Nagasawa, M. Imamura, and K. Matsushima. 2010. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115: 5401-5411.
28. Yao, Y., X. Song, H. Cheng, G. Tang, X. Hu, H. Zhou, and J. Wang. 2014. Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. *PLoS One* 9: e104607.
29. Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, and T. Kishimoto. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382: 635-638.
30. Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595-599.
31. Lataillade, J. J., D. Clay, P. Bourin, F. Herodin, C. Dupuy, C. Jasmin, and M. C. Le Bousse-Kerdiles. 2002. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by

- suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 99: 1117-1129.
32. Guimond, M., A. G. Freud, H. C. Mao, J. Yu, B. W. Blaser, J. W. Leong, J. B. Vandeusen, A. Dorrance, J. Zhang, C. L. Mackall, and M. A. Caligiuri. 2010. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J Immunol* 184: 2769-2775.
  33. Higano, C. S., N. J. Vogelzang, J. A. Sosman, A. Feng, D. Caron, and E. J. Small. 2004. Safety and biological activity of repeated doses of recombinant human Flt3 ligand in patients with bone scan-negative hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10: 1219-1225.
  34. Zou, W., V. Machelon, A. Coulomb-L'Hermin, J. Borvak, F. Nome, T. Isaeva, S. Wei, R. Krzysiek, I. Durand-Gasselien, A. Gordon, T. Pustilnik, D. T. Curiel, P. Galanaud, F. Capron, D. Emilie, and T. J. Curiel. 2001. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7: 1339-1346.
  35. Luther, S. A., A. Bidgol, D. C. Hargreaves, A. Schmidt, Y. Xu, J. Paniyadi, M. Matloubian, and J. G. Cyster. 2002. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 169: 424-433.
  36. Garnica, M. R., L. V. de Moraes, L. V. Rizzo, and H. F. de Andrade, Jr. 2005. Supplementation of CXCL12 (CXCL12) induces homing of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells to the spleen and enhances control of *Plasmodium berghei* malaria in BALB/c mice. *Immunology* 115: 399-406.
  37. Takebayashi, M., R. Amakawa, K. Tajima, M. Miyaji, K. Nakamura, T. Ito, N. Matsumoto, Y. Miyazaki, K. Zen, Y. Kishimoto, and S. Fukuhara. 2004. Blood dendritic cells are decreased in acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 33: 989-996.
  38. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Hetu, D. C. Roy, and C. Perreault. 1999. The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J Immunol* 163: 6462-6467.
  39. Nguyen Hoang, A. T., H. Liu, J. Juarez, N. Aziz, P. M. Kaye, and M. Svensson. 2010. Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. *J Immunol* 185: 2360-2371.
  40. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95: 3489-3497.

41. Chklovskaya, E., C. Nissen, L. Landmann, C. Rahner, O. Pfister, and A. Wodnar-Filipowicz. 2001. Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood* 97: 1027-1034.
42. Alpdogan, O., S. J. Muriglan, J. M. Eng, L. M. Willis, A. S. Greenberg, B. J. Kappel, and M. R. van den Brink. 2003. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 112: 1095-1107.
43. Mensen, A., K. Johrens, I. Anagnostopoulos, S. Demski, M. Oey, A. Stroux, P. Hemmati, J. Westermann, O. Blau, F. Wittenbecher, K. Movassaghi, M. Szyska, S. Thomas, B. Dorken, C. Scheibenbogen, R. Arnold, and I. K. Na. 2014. Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT. *Blood* 124: 963-972.
44. Shono, Y., S. Shiratori, M. Kosugi-Kanaya, S. Ueha, J. Sugita, A. Shigematsu, T. Kondo, D. Hashimoto, K. Fujimoto, T. Endo, M. Nishio, S. Hashino, Y. Matsuno, K. Matsushima, J. Tanaka, M. Imamura, and T. Teshima. 2014. Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 495-500.
45. von Bonin, M., and M. Bornhauser. 2014. Concise review: the bone marrow niche as a target of graft versus host disease. *Stem Cells* 32: 1420-1428.
46. Qian, S., L. Lu, F. Fu, W. Li, F. Pan, R. J. Stoeckle, F. G. Chambers, T. E. Starzl, J. J. Fung, and A. W. Thomson. 1998. Donor pretreatment with Flt-3 ligand augments antidonor cytotoxic T lymphocyte, natural killer, and lymphokine-activated killer cell activities within liver allografts and alters the pattern of intra-graft apoptotic activity. *Transplantation* 65: 1590-1598.
47. Blazar, B. R., H. J. McKenna, A. Panoskaltsis-Mortari, and P. A. Taylor. 2001. Flt3 ligand (FL) treatment of murine donors does not modify graft-versus-host disease (GVHD) but FL treatment of recipients post-bone marrow transplantation accelerates GVHD lethality. *Biol Blood Marrow Transplant* 7: 197-207.
48. Sinha, M. L., T. J. Fry, D. H. Fowler, G. Miller, and C. L. Mackall. 2002. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 100: 2642-2649.
49. Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166: 5327-5330.
50. Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2007. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107-111.

51. Jinquan, T., S. Quan, H. H. Jacobi, H. O. Madsen, C. Glue, P. S. Skov, H. J. Malling, and L. K. Poulsen. 2000. CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis in CD4+ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* 99: 402-410.
52. Bilsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108: 481-492.
53. Chung, B., E. Dudl, A. Toyama, L. Barsky, and K. I. Weinberg. 2008. Importance of interleukin-7 in the development of experimental graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 16-27.
54. Gendelman, M., T. Hecht, B. Logan, S. Vodanovic-Jankovic, R. Komorowski, and W. R. Drobyski. 2004. Host conditioning is a primary determinant in modulating the effect of IL-7 on murine graft-versus-host disease. *J Immunol* 172: 3328-3336.
55. Perales, M. A., J. D. Goldberg, J. Yuan, G. Koehne, L. Lechner, E. B. Papadopoulos, J. W. Young, A. A. Jakubowski, B. Zaidi, H. Gallardo, C. Liu, T. Rasalan, J. D. Wolchok, T. Crougns, M. Morre, S. M. Devlin, and M. R. van den Brink. 2012. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 120: 4882-4891.

## FOOTNOTES

### **Abbreviations used in this article**

Allo-SCT, allogeneic stem cell transplantation; CDP, common DC progenitors; CTV, cell trace violet; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; DC, dendritic cells; Flt3-L, fms-like tyrosine kinase 3 ligand; GVHD, graft-versus-host disease; HP, homeostatic proliferation; HSC, hematopoietic stem cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells; SDF-1 $\alpha$ , stromal-derived factor 1 alpha.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *Loss of CD4 HP during GVHD.* (A) Irradiated B6D2F<sub>1</sub> recipients received  $1 \times 10^7$  HSCs from IL-7R $\alpha^{-/-}$  or Rag $^{-/-}$  mice with  $1 \times 10^6$  allogeneic B6 (GVHD) or syngeneic B6D2F<sub>1</sub> (non-GVHD) purified splenic T cells. Twenty-eight days later, mice received CTV-labeled anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells. Seven days later, proliferation was assessed based on CTV dilution. (B) Weights of transplanted animals were measured 3 times per week and averaged for the group (thin dotted line: syngeneic T cells + IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM recipient; dark dotted line: GVHD Rag $^{-/-}$  BM recipient; dark line: GVHD IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM recipient). Measures were compared as a percentage change from day 0 and were pooled from 3 experiments. (C) Survival curve of mice from each group described in (A) (thin dotted line: syngeneic T cells + IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM recipient; dark dotted line: GVHD Rag $^{-/-}$  BM recipient; dark line: GVHD IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM recipient) Data was pooled from 3 experiments. (D) Total CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells were counted in non-GVHD (white bars) and GVHD hosts (black bars) 35 days post-allo-SCT. (E) Anti-HY CD4<sup>+</sup> T cell proliferation 7 days after transfer into GVHD or non-GVHD animals. Upper right: Anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells from GVHD animals were retransferred into secondary IL-7R $\alpha^{-/-}$  recipients and proliferation assessed 1 week later. (F) Absolute number of anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells in GVHD and non-GVHD hosts 7 days after transfer. Data are representative of 2 or 3 independent experiments, 3 mice per group. Results show mean  $\pm$  s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*\*p $\leq$ 0.01, \*\*\*p $\leq$ 0.001).

**Figure 2.** *GVHD constrains DC regeneration and IL-7 production.* (A) DCs from the spleen were analyzed 35 days after allo-SCT by flow cytometry. (B) Absolute number of each DC subsets in the spleen of mice transplanted with IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM. (C) Histogram representative of CD4 HP after



DC depletion. B6D2F<sub>1</sub> recipients were transplanted with 10x10<sup>6</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup>CD11cDTR BM. Eight weeks later, 1x10<sup>6</sup> CTV-labelled anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells were transferred into chimeric mice and diphtheria toxin was given at days -1, +1 and +3. Proliferation was assessed by flow cytometry 7 days after transfer. **(D)** Relative expression of IL-7 mRNA from the spleen and BM stromal cells of GVHD and non-GVHD B6D2F<sub>1</sub> recipients. **(E)** Estimation of systemic IL-7 by transferring anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells into non-GVHD (grey line) and GVHD (black line) hosts and assessing IL-7R $\alpha$  expression 24h later. Shaded histogram represent unstained control. Data are representative of 2-3 independent experiments, 3 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*\*p $\leq$ 0,01; \*\*\*p $\leq$ 0,001).

**Figure 3.** *Elimination of donor-derived DCs by GVHD T cells.* Donor, recipient or donor-derived DCs were isolated and stained with CFSE or CTV prior to their transfer into non-GVHD or GVHD animals. Mice were killed 36h after injection and DC numbers in the spleen were evaluated by flow cytometry. **(A)** Schematic representation of the experimental design where *in vivo* cytotoxicity toward DCs was assessed in GVHD and non-GVHD hosts. 1) B6D2F<sub>1</sub> mice were transplanted with B6 BM and donor-derived (B6 $\rightarrow$ B6D2F<sub>1</sub>) DCs were isolated 6 weeks later. 2) CTV-labelled recipient (B6D2F<sub>1</sub>) or donor-derived (B6 $\rightarrow$ B6D2F<sub>1</sub>) DCs were transferred at the same ratio with CFSE-labelled donor (B6) DCs in non-GVHD or GVHD B6D2F<sub>1</sub> recipients. **(B)** Representative dot plot of 3 independent experiments comparing the recovery of recipient (B6D2F<sub>1</sub>) or donor-derived (B6 $\rightarrow$ B6D2F<sub>1</sub>) DCs versus donor (B6) DCs in the spleen of non-GVHD or GVHD hosts. Histograms show the ratio of DC numbers recovered after transfer in non-GVHD or GVHD recipients. Data are representative of 3 independent experiments. 3 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*p $\leq$ 0,05;

\*\*p≤0,01). (C) Transplanted mice were treated with anti-CD4 and anti-CD8 28 days after SCT. Spleen dendritic cells were evaluated 2 months post-T cell depletion by flow cytometry (□: SYN; ▨: SYN T cell depleted; ■: GVHD; ▩: GVHD T cell depleted). Data are representative of 2 independent experiments. 3 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (\*p≤0,05; \*\*p≤0,01).

**Figure 4.** *Common DC progenitors as well as SDF-1α levels are diminished in GVHD mice.* (A) Representative dot plot analysis and absolute counts of common DC progenitors (CDP) in non-GVHD and GVHD BM 35 days post-SCT. CDP were gated as Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>int</sup>Sca-1<sup>-</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> cells. (B) 6x10<sup>6</sup> BM cells from non-GVHD or GVHD mice were cultured *in vitro* for 7 days with Flt3-L to generate DCs. Percentages represent % of CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> on total cells. (C) Flt3-L mRNA relative expression in BM and spleen stromal cells 35 days post-SCT. (D) Flt3-L levels in plasma of transplanted animals 35 days post-SCT. (E) Flt3 (CD135) mRNA relative expression in Lin<sup>-</sup> HSC of non-GVHD and GVHD mice 35 days post-SCT. (F) SDF-1α mRNA relative expression in BM and spleen stromal cells 35 days post-SCT. (G) CXCR4 mRNA relative expression in Lin<sup>-</sup> BM cells of non-GVHD and GVHD mice 35 days post-SCT. (H) SDF-1α levels in plasma of transplanted animals 35 days post-SCT. Data are representative of 2-3 independent experiments. 3 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*p≤0,05; \*\*p≤0,01; \*\*\*p≤0,001).

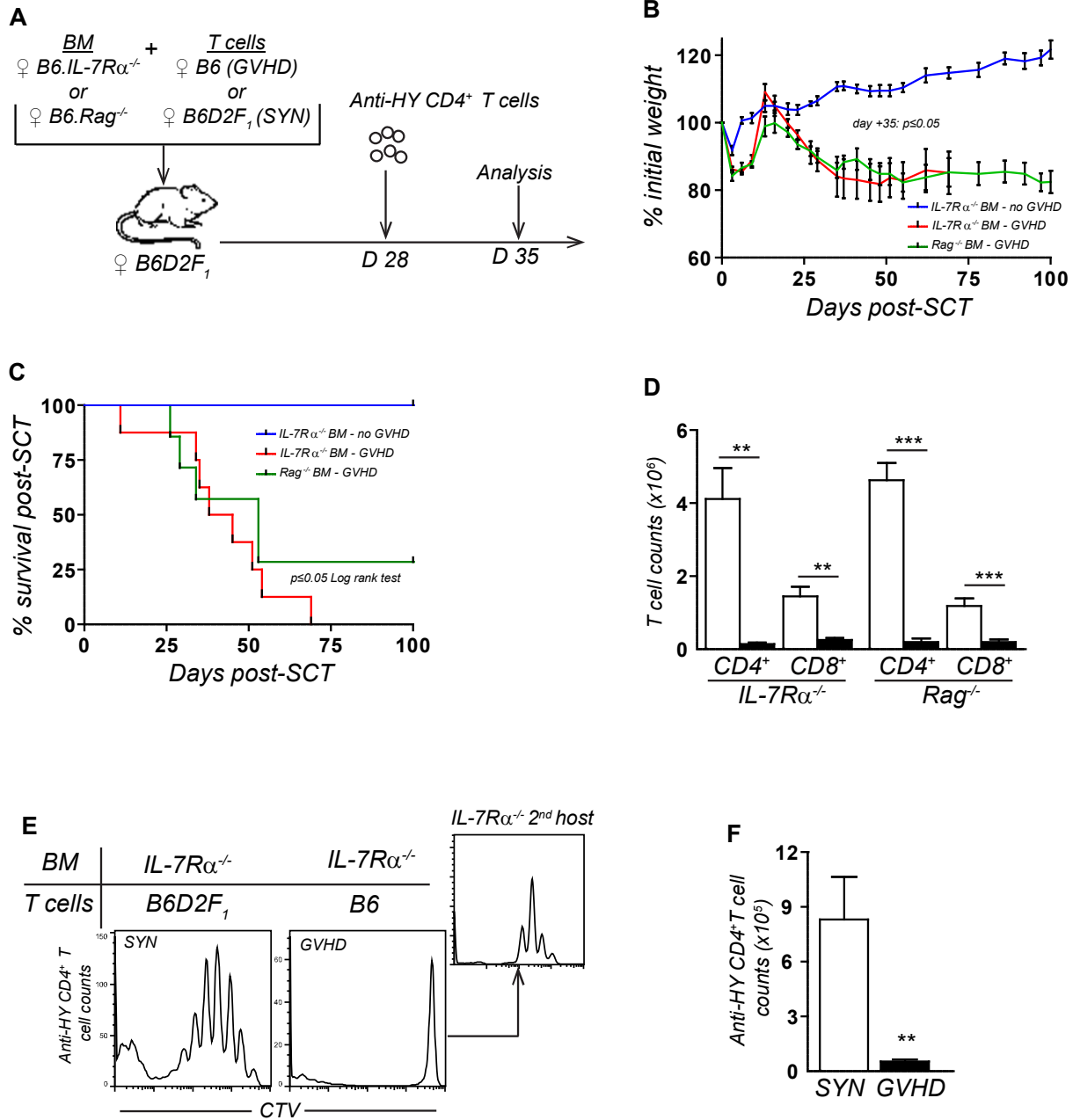
**Figure 5.** *Flt3-L and SDF-1α increase DCs in GVHD.* (A) Representative dot plot analysis of non-GVHD or GVHD mice treated for 14 days with Flt3-L or PBS starting at day +28 post-SCT. (B) Absolute counts of CD11c<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> and mPDCA<sup>+</sup> cells after Flt3-L

treatment (□: SYN; ■: GVHD+PBS; ▨: GVHD + Flt3-L). (C) Representative dot plot analysis of non-GVHD and GVHD mice treated for 14 days with SDF-1 $\alpha$  or PBS starting at day +28 post-SCT. (D) Absolute counts of CD11c<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> and mPDCA<sup>+</sup> cells after SDF-1 $\alpha$  treatment (□: SYN; ■: GVHD+PBS; ▨: GVHD + SDF-1 $\alpha$ ). (E) Absolute counts of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> cells after SDF-1 $\alpha$  treatment. (F) Comparative histogram of CD11c<sup>+</sup> absolute cell counts after Flt3-L or SDF-1 $\alpha$  treatments. (G) Body weight of GVHD mice treated with PBS (●, vs SDF-1 $\alpha$  p=0.018), Flt3-L (▼, vs SDF-1 $\alpha$  p=0.012) or SDF-1 $\alpha$  (■) and non-GVHD mice (▲, vs SDF-1 $\alpha$  p=0.004). P-values were determined by a Mann-Whitney test. (H) Histopathology score (sum of all organs) of non-GVHD and GVHD mice treated with PBS, Flt3-L or SDF-1 $\alpha$ . Data are representative of 2-3 independent experiments. 3-5 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (\*p $\leq$ 0,05; \*\*p $\leq$ 0,01).

**Figure 6.** *Flt3-L or SDF-1 $\alpha$  combined to IL-7 can restore CD4 homeostatic proliferation during GVHD.* (A) Irradiated wild-type B6D2F<sub>1</sub> mice received 1x10<sup>7</sup> HSCs from IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice with 1x10<sup>6</sup> allogeneic B6 (GVHD) or syngeneic B6D2F<sub>1</sub> (non-GVHD) purified splenic T cells. Twenty-eight days later, mice were treated with Flt3-L or SDF-1 $\alpha$  for 14 consecutive days. At day +35, mice received CTV-labeled anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells. Mice were then treated with daily IL-7 injections. At day +42, mice were sacrificed and CD4<sup>+</sup> T cell HP was evaluated by flow cytometry. (B) Representative histograms of CTV dilution of anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells in different groups of treated animals. (C) Percentage of divided Marilyn CD4<sup>+</sup> T cells 7 days after transfer. (D) Absolute count of anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells recovered from the spleen one week after transfer in GVHD mice treated with PBS, IL-7, Flt3-L+IL-7 or SDF-1 $\alpha$ +IL-7. Data are representative of 2-3 independent

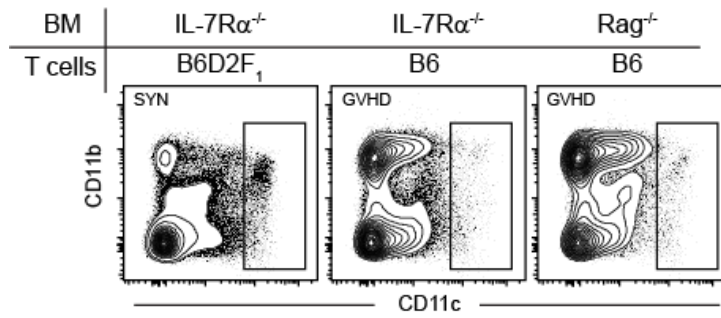
experiments. 3 mice per group. Results show mean  $\pm$  s.e.m. P-values were determined by a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

**Figure 1**

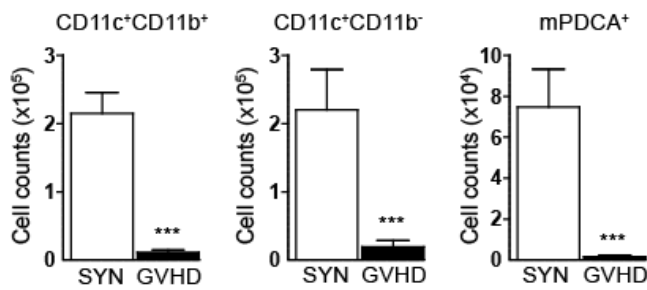


**Figure 2**

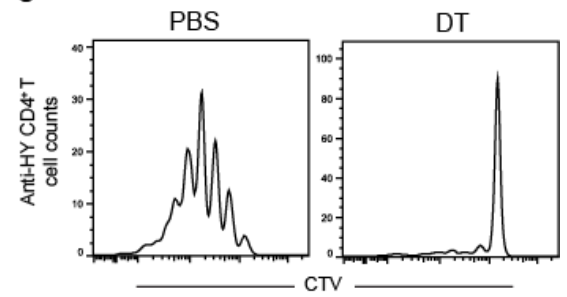
**A**



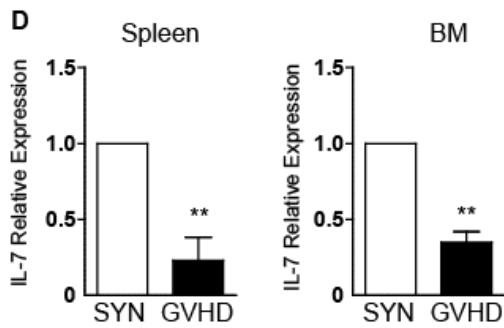
**B**



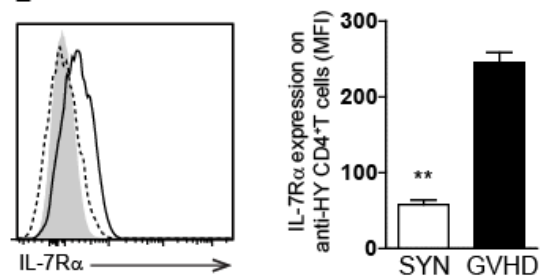
**C**



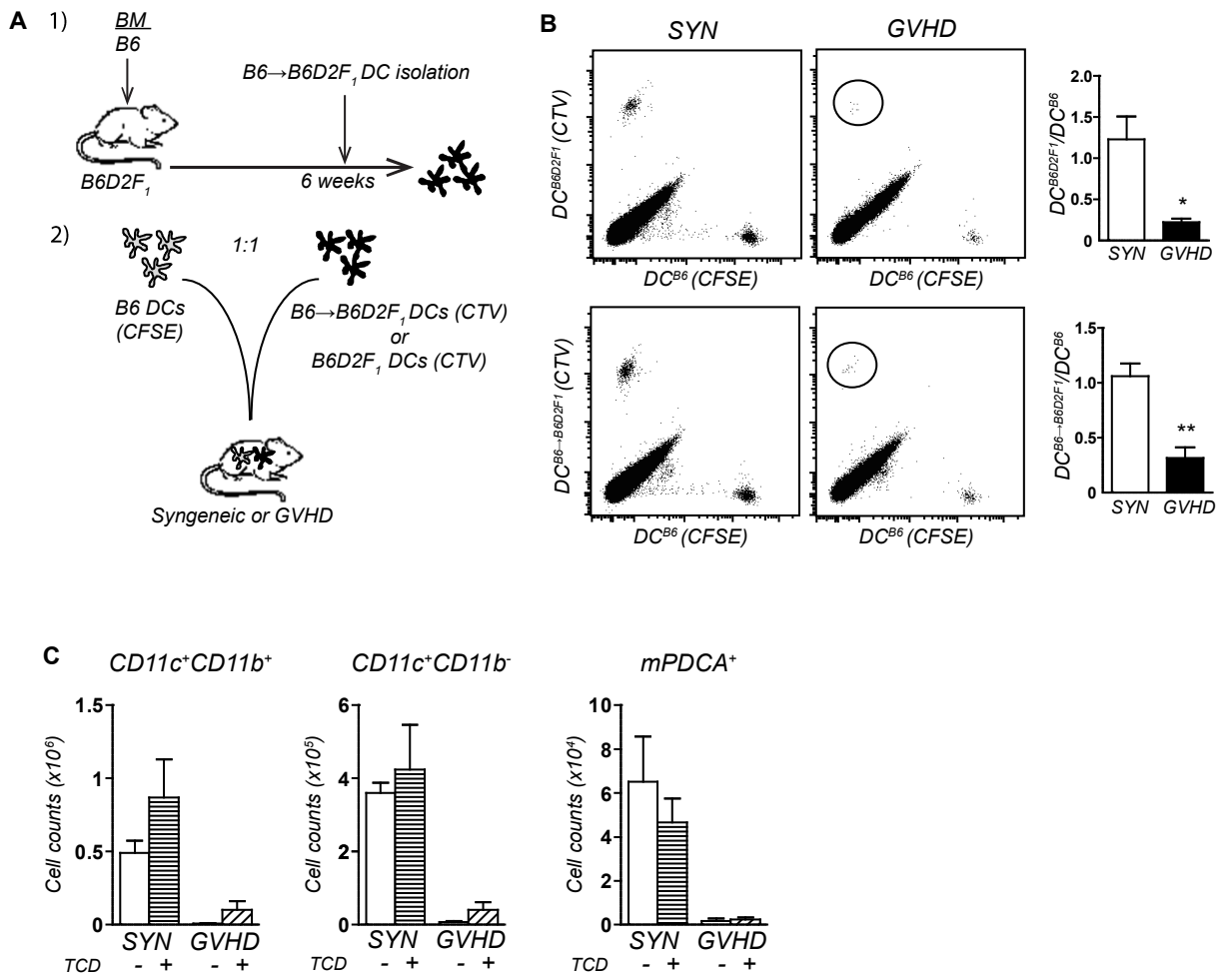
**D**



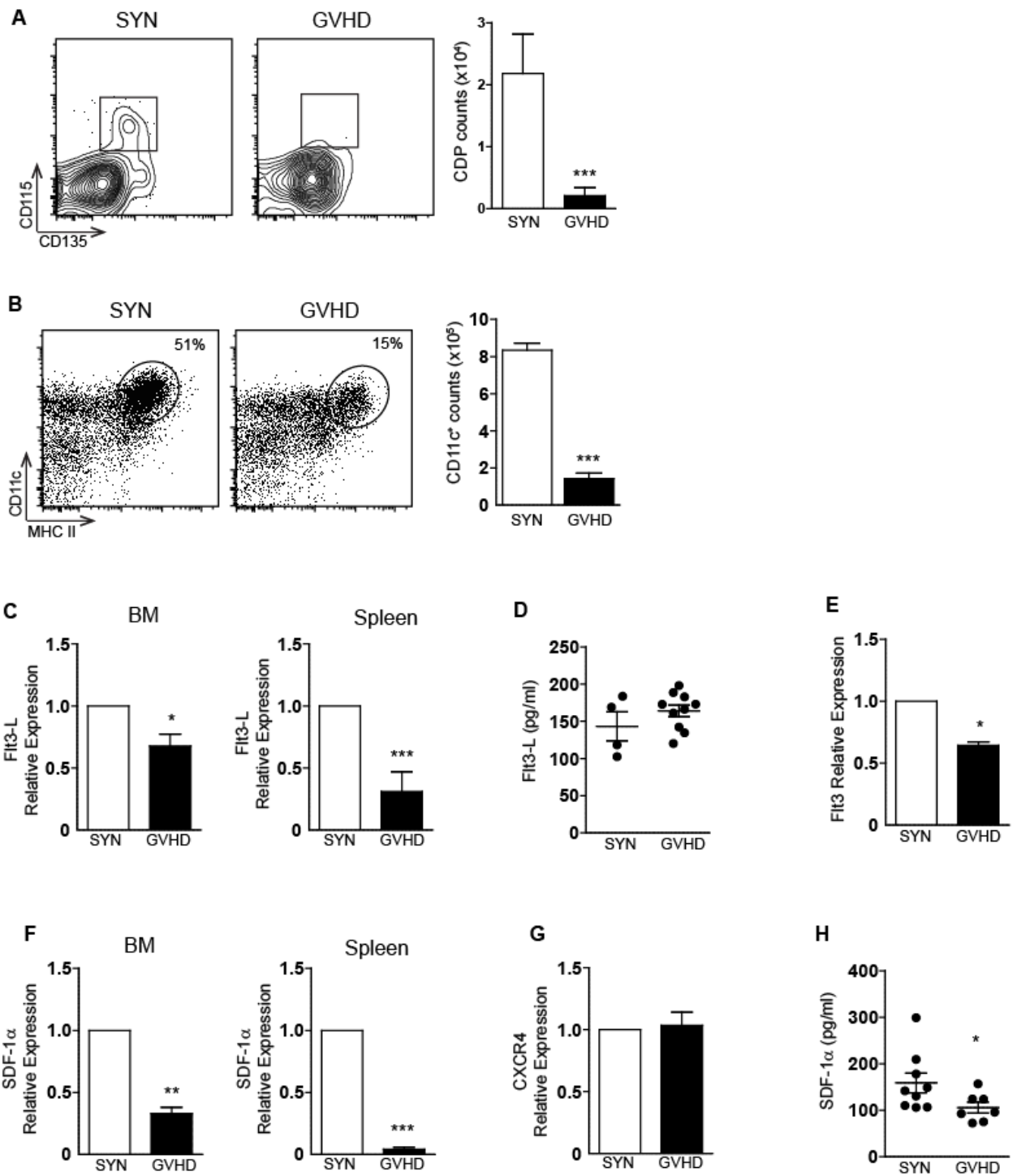
**E**



**Figure 3**

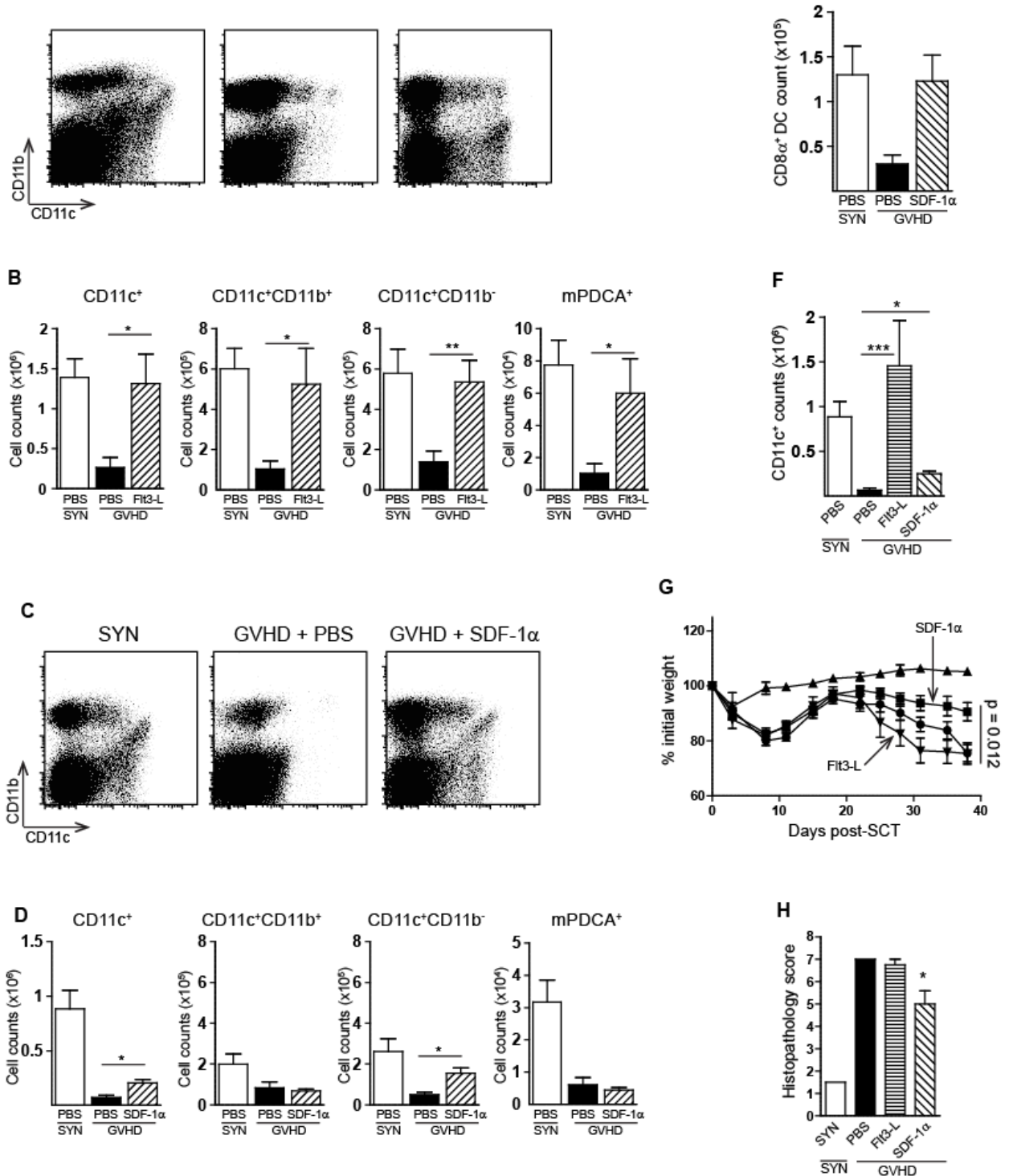


**Figure 4**

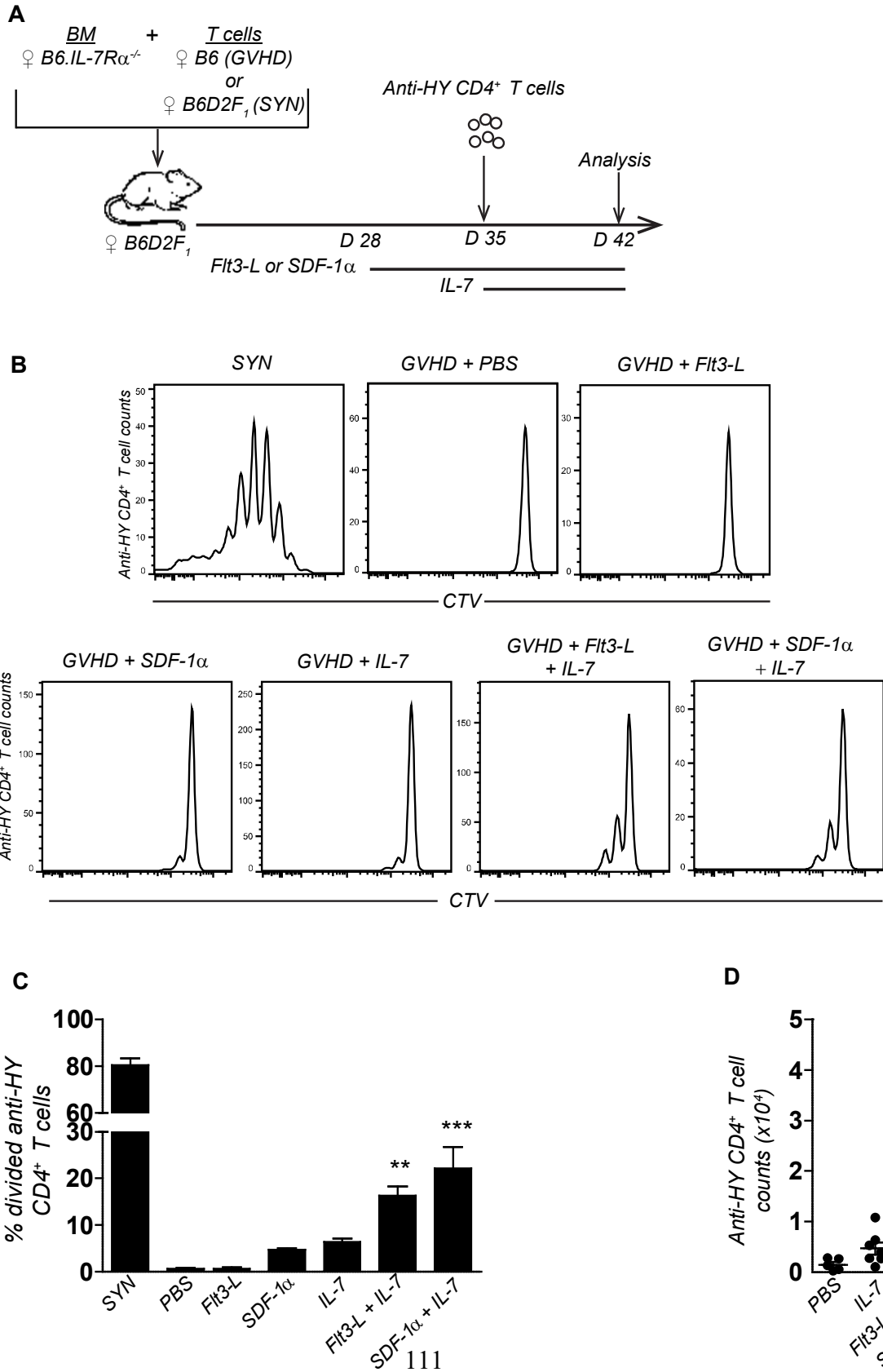


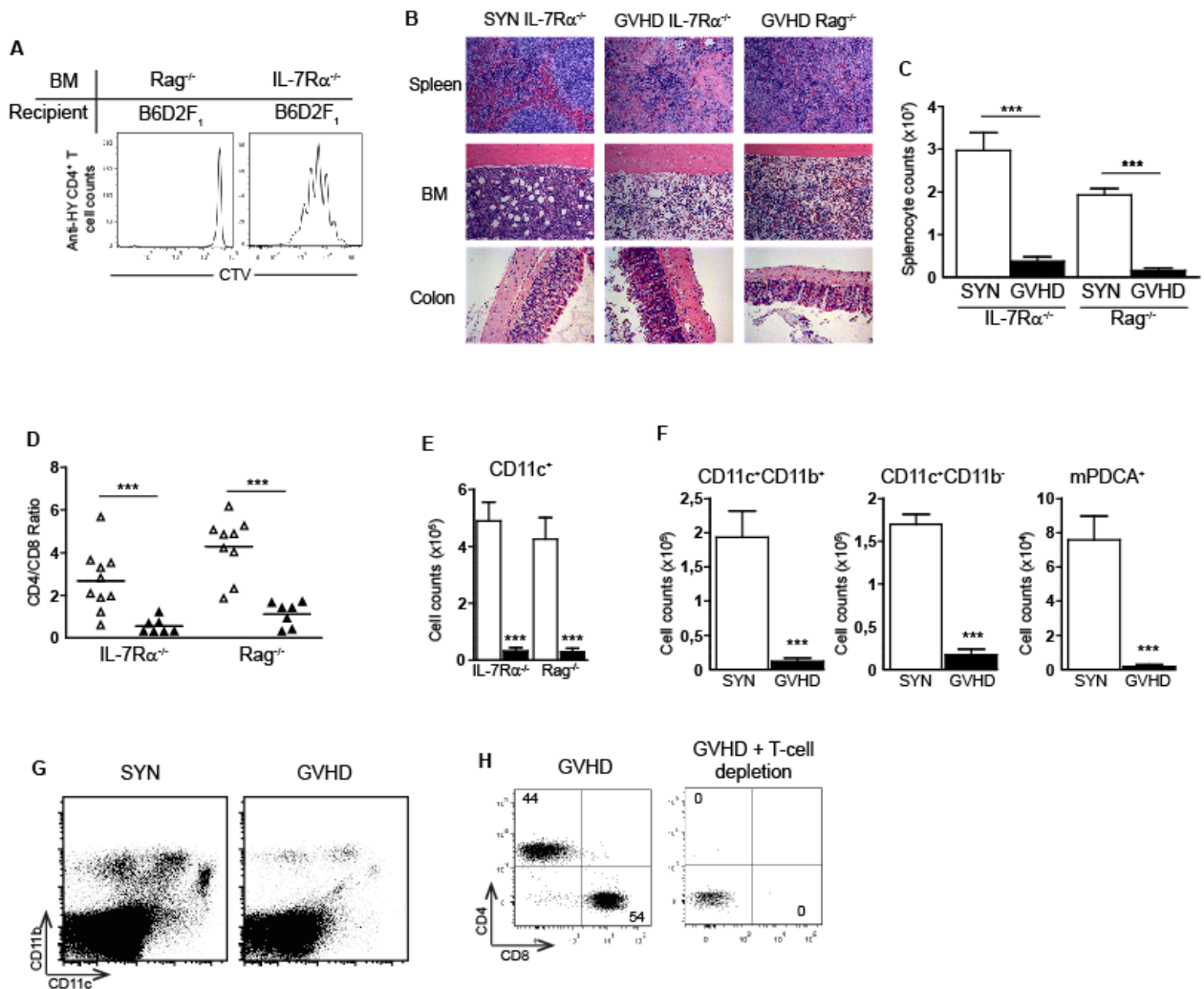


**Figure 5**



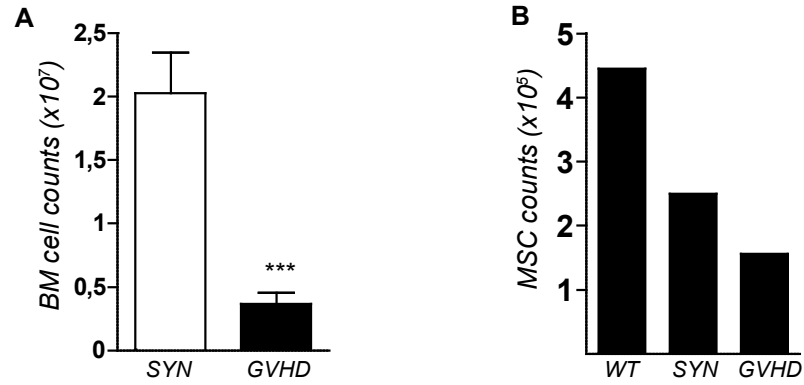
**Figure 6**



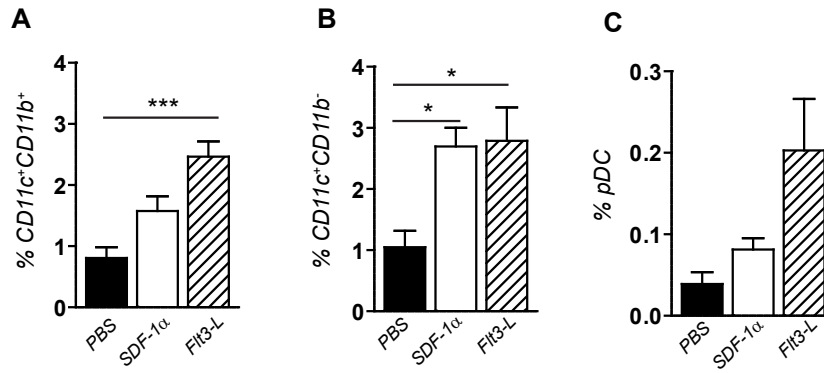


**Supplementary Figure 1. Lack of IL-7 signaling in DCs does not affect GVHD severity.**

(A) B6D2F<sub>1</sub> recipients were irradiated and transplanted with 1x10<sup>7</sup> BM cells from Rag<sup>+</sup> or IL-7Rα<sup>-</sup> mice. At day +28 post-SCT, CTV labelled anti-HY CD4<sup>+</sup> T cells were transferred and 7 days later, HP of Marilyn cells was evaluated by flow cytometry. Proliferation is observed only in B6D2F<sub>1</sub> recipient transplanted with IL-7Rα<sup>-</sup> BM. (B) Histopathology analysis of the spleen, BM and colon of mice from each group described in Fig. 1A viewed at 10X after hematoxylin and eosin staining. (C) Splenocytes count in GVHD and non-GVHD hosts 35 days post-allo-SCT. (D) CD4/CD8 ratio in non-GVHD hosts (white triangles) and GVHD hosts (black triangles) at day +35 post-SCT. (E) CD11c<sup>+</sup> cell counts 35 days post-SCT in the spleen of GVHD mice transplanted with Rag<sup>+</sup> or IL-7Rα<sup>-</sup> BM cells (white: syngeneic; black: GVHD). (F) DC subsets in GVHD recipients 35 days after transplantation with Rag<sup>+</sup> BM. (G) Dot plot representative of DC reconstitution 28 days after allo-SCT in B6D2F<sub>1</sub> recipients transplanted with wild type B6 BM. (H) T-cell depletion 28 days post-SCT. T cells were depleted with anti-CD4 and anti-CD8 moAbs at days +28 and +30 post-SCT. T-cell depletion was assessed 2 months later. Dot plots are representative of 2 independent experiments. Numbers show percentage of TCRβ positive cells in the spleen. Data are representative of 2 or 3 independent experiments, 3-5 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test (\*\*\*p<0,001).



**Supplementary Figure 2.** GVHD affects BM cellularity and MSC numbers. **(A)** BM cell counts 35 days post-SCT in B6D2F<sub>1</sub> recipients transplanted with IL-7R $\alpha^{-/-}$  BM and  $1 \times 10^6$  B6D2F<sub>1</sub> T cells (syngeneic, SYN) or  $1 \times 10^6$  B6 T cells (allogeneic, GVHD). Data are representative of  $\geq 3$  independent experiments, 3-5 mice per group. Results show mean  $\pm$  s.e.m. P-values were determined by a Mann-Whitney test ( $***p \leq 0,001$ ). **(B)** Absolute number of mesenchymal stromal cells (MSC) in transplanted mice. BM from 10 B6 WT, syngeneic or GVHD mice was pooled and cultured in MensenCult MSC Basal Medium (Stemcell Technologies). After one week, cells were harvested and MSCs enumerated by flow cytometry. Experiment was done once.



**Supplementary Figure 3.** *Flt3-L* regenerates different DC subsets compared to *SDF-1 $\alpha$*  in GVHD mice. **(A)** % of  $CD11c^+CD11b^+$  cells, **(B)** % of  $CD11c^+CD11b^-$  cells and **(C)** % of pDCs in spleen of treated animals. Data representative of 3 independent experiments, 3 mice per group. Results show mean  $\pm$  s.e.m. *P*-values were determined by a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Supplementary Table I. Histopathological scoring of GVHD

<b>Organs</b>	<b>Features</b>	<b>Scale</b>
<b>Colon</b>		
	<i>Villous blunting</i>	<i>0, 0.5 or 1</i>
	<i>Inflammatory cell infiltration</i>	<i>0, 0.5 or 1</i>
	<i>Crypt abnormality</i>	<i>0, 0.5 or 1</i>
	<i>Crypt hyperplasia</i>	<i>0, 0.5 or 1</i>
<b>Spleen (progressive scale)</b>		
	<i>Focal white pulp infiltrates</i>	<i>1</i>
	<i>More than 50% of white or red pulp infiltration</i>	<i>2</i>
	<i>Effacement of splenic architecture</i>	<i>3</i>
	<i>Fibrotic replacement</i>	<i>4</i>
<b>Bone marrow</b>		
	<i>Abnormality (hemorrhage, fibrosis, monotonous infiltration)</i>	<i>0 or 1</i>

## **Chapitre 3: Article 2**

### **Non-hematopoietic MHC I antigen presenting cells are sufficient for CD8 regeneration mediated by IL-7 therapy during GVHD**

Simon-David Gauthier, Dominique Leboeuf and Martin Guimond

Cet article est en préparation et sera soumis en 2015.

**Non-hematopoietic MHC I antigen presenting cells are sufficient for CD8 regeneration mediated by IL-7 therapy during GVHD**

Simon-David Gauthier<sup>1,2</sup>, Dominique Leboeuf<sup>1</sup> and Martin Guimond<sup>1,2,\*</sup>.

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC, Canada. <sup>2</sup>Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Running Title: IL-7 therapy alone can restore CD8 HP during GVHD.

\* To whom correspondence should be addressed:

Dr. Martin Guimond,

Assistant Professor,

Department of Microbiology-Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal

Department of Hematology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415, Boulevard de l'Assomption, Montreal, H1T 2M4

Key words: GVHD, Homeostatic Proliferation, CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes, IL-7.



## **ABSTRACT**

Immune reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) relies on homeostatic proliferation (HP) of mature T lymphocytes but this process is typically impaired during graft-versus-host disease (GVHD). During GVHD, we showed that systemic IL-7 and dendritic cells (DCs) counts were low and constrained CD4 HP and we asked whether these factors also contribute to delayed immune reconstitution of naïve CD8<sup>+</sup> T cells. Here we found that forcing DC recovery with Flt3-Ligand administration was not essential for IL-7 therapy to induce CD8 HP in GVHD hosts. Using MHC I<sup>-/-</sup> bone marrow chimeras, we show that optimal HP of naïve CD8<sup>+</sup> T cells requires MHC I expression by at least radio-resistant stromal cells. Nonetheless, hematopoietic cells can provide sufficient TCR triggering to CD8<sup>+</sup> T cells to promote HP but with diminished amplitude. Thus, the ability of naïve CD8<sup>+</sup> T cells to receive TCR stimulation from non-hematopoietic cells explains in part why immune reconstitution of CD8<sup>+</sup> T cells is typically faster than CD4<sup>+</sup> T cells in most clinical setting of human lymphopenia.

## INTRODUCTION

Graft-versus-host disease (GVHD) is the main complication of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) and significantly contributes to diminish the overall survival of transplanted patients (Ferrara et al., 2009). The adverse effect of GVHD on immune reconstitution of T lymphocytes is well known and patients with GVHD are normally at higher risk to develop infectious complications and in some cases disease recurrence (Bosch et al., 2012; Chang et al., 2012; Mackall et al., 2009; Servais et al., 2014). Early after allo-SCT, peripheral mechanisms that regulate homeostatic proliferation (HP) of T lymphocytes become essential in order to restore T cell counts and provide immune competence to the greatest extent. However, several studies have demonstrated that GVHD insults to the peripheral lymphoid niche was the most important factor for limiting thymic independent T cell regeneration after allo-SCT (Dulude et al., 1999; Gorski et al., 2007) (and Gauthier et al. 2015, submitted).

Animal studies have demonstrated that T cell receptor (TCR) stimulation and IL-7 are both essential for the homeostatic maintenance of naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in vivo (Ernst et al., 1999; Labrecque et al., 2001; Lantz et al., 2000; Rathmell et al., 2001). Following post-natal T cell depletion, the increased bioavailability of these factors represents the driving force that promotes HP of naïve T cells (Goldrath and Bevan, 1999; Napolitano et al., 2001; Tan et al., 2001). However, we recently demonstrated that DC counts and systemic IL-7 were abnormally low in GVHD despite profound lymphopenia and this contributed to limit immune reconstitution of naïve CD4<sup>+</sup> T cells (Gauthier et al. 2015, submitted). In this work, we asked

whether DC depletion and low IL-7 levels were also responsible for delayed immune reconstitution of naïve CD8<sup>+</sup> T cells in GVHD hosts.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Homeostatic proliferation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells is constrained in GVHD hosts.**

We used non-alloreactive TCR transgenic ovalbumin specific T cells (OT-I) to study the impact of GVHD on naïve CD8<sup>+</sup> T cells HP. GVHD was induced by transplanting T cell depleted (TCD) B6.SJL bone marrow (BM) cells and T lymphocytes into lethally irradiated MHC-mismatched B6D2F<sub>1</sub> recipients (GVHD) (Figure 1A). Control mice were transplanted with TCD B6.SJL BM cells and syngeneic B6D2F<sub>1</sub> T cells (SYN). By day +28, all the mice in the GVHD groups had developed clinical signs of GVHD (data not shown). At day +35 post-allo-SCT, we tested the functionality of the peripheral CD8 niche by transferring CTV-labelled OT-I T cells into GVHD and non-GVHD mice to measure the impact of GVHD on their proliferation. Seven days later, OT-I T cells were retrieved from transplanted animals and examined for proliferation. It is important to stress that OT-I T cells used to evaluate the functionality of the peripheral lymphoid niche in GVHD mice cannot undergo T cell activation since they are specific to the ovalbumin antigen which is absent in transplanted mice. In addition, OT-I lymphocytes cannot elicit reactivity from B6D2F<sub>1</sub> T cells since they are derived from the C57BL/6 background. Thus, in this model, the proliferation of OT-I T cells should result from HP and not T cell activation.

By day +42 post-allo-SCT, GVHD animals had significantly lower splenocyte counts and fewer DCs compared to non-GVHD mice, confirming that GVHD impairs immune reconstitution of T cells and DCs after allo-SCT (Figure 1B-C ) (Gauthier et al. 2015, submitted). We then evaluated CD8 HP in transplanted animals. OT-I T cells underwent weak proliferation in non-GVHD mice, mainly due to the presence of donor derived T lymphocytes that have developed into B6D2F<sub>1</sub> recipients (Figure 1D, upper left panel). More importantly, despite severe lymphopenia in GVHD mice, OT-I T cells could not undergo HP, confirming the adverse effect of GVHD on the CD8 peripheral niche (Figure 1D middle left panel and Figure 1E)(Ernst et al., 1999; Goldrath et al., 2002). Since GVHD mice have lower DC counts and diminished systemic IL-7, we asked whether the bioavailability of these factors constrained CD8 HP during GVHD (Gauthier et al. 2015, submitted).

### **Interleukin-7 therapy alone can restore CD8 HP in GVHD hosts**

Flt3-Ligand (Flt3-L) administration can increase DC counts in mice and when co-administered with IL-7 therapy, it can improve CD4 HP during GVHD (Gauthier et al. 2015, submitted). To understand the potential contribution of DCs and IL-7 on immune reconstitution of naïve CD8<sup>+</sup> T cells, we administered Flt3-L and IL-7 to GVHD mice and measured the effect on CD8 HP. In GVHD hosts, Flt3-L administration induced a robust expansion of DCs but OT-I proliferation in these mice was much lower compared to the proliferation induced by IL-7 therapy alone (Figure 1D). Despite the modest effect of Flt3-L on CD8 proliferation, the accumulation of OT-I T cells was similar to that observed with IL-7 therapy (Figure 1E). Importantly, when Flt3-L was combined with IL-7 therapy, the accumulation of CD8<sup>+</sup> T cells increased by 4 folds (Figure

1E). These results suggest that DCs are probably not essential for HP of CD8<sup>+</sup> T cells but they perhaps contribute to maintain their numbers during lymphopenia and GVHD.

### **CD8<sup>+</sup> T cells are more sensitive than CD4<sup>+</sup> T cells to IL-7**

Homeostatic proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells is typically more efficient than CD4<sup>+</sup> T cells and the abundance of MHC I expression in the periphery has been invoked to explain this difference (Guimond et al., 2005). Given that TCR triggering controls IL-7 responsiveness in CD4<sup>+</sup> T cells, we sought to determine whether CD8<sup>+</sup> T cells were more sensitive to IL-7 (Hennion-Tscheltzoff et al., 2013). We incubated polyclonal T lymphocytes with varying concentrations of IL-7 and measured Stat5 phosphorylation in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. As depicted in Figure 2A, the phosphorylation of Stat5 was induced at a lower IL-7 concentration in CD8<sup>+</sup> T cells compared to CD4<sup>+</sup> T cells, confirming that CD8<sup>+</sup> T cells are more sensitive to IL-7. We then studied T cell proliferation and found that CD8<sup>+</sup> T cells proliferated at lower IL-7 concentrations (1 µg/day) compared to CD4<sup>+</sup> T cells (2.5 µg/day) (Figure 2B). Thus, CD8<sup>+</sup> T cells are more sensitive than CD4<sup>+</sup> T cells to IL-7.

### **MHC I expression by non-hematopoietic antigen presenting cells can drive CD8 HP during IL-7 therapy**

While some studies have indicated that MHC I expression by DCs was sufficient for CD8 HP and that loss of DCs impaired their proliferation (Gruber and Brocker, 2005; Zaft et al., 2005), other studies have found that CD8<sup>+</sup> T cells could still proliferate despite CD11c<sup>+</sup> depletion (Schluns et al., 2000; Zaft et al., 2005). We used MHC I<sup>-/-</sup> BM chimeras to investigate

the role of MHC I expression by hematopoietic and non-hematopoietic antigen presenting cells in CD8 HP mediated by IL-7 therapy. We limited MHC I expression on hematopoietic cells by transplanting  $\beta 2m^{-/-}$  mice with  $Rag^{-/-}$  BM cells, or stromal cells by transplanting  $Rag^{-/-}$  mice with  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}$  BM cells (Figure 3A-B). Two months after transplantation, we transferred CTV-labelled OT-I lymphocytes and 7 days later we measured their proliferation.

When transferred into  $\beta 2m^{-/-}$  recipients, OT-I T cells disappeared rapidly even if mice were treated with IL-7, confirming the absolute requirement of TCR triggering by MHC I in CD8 homeostasis (data not shown). When MHC I was limited to hematopoietic cells ( $Rag^{-/-}\rightarrow\beta 2m^{-/-}$ ), OT-I T cells underwent HP but the magnitude of proliferation tended to be much lower than in CD8<sup>+</sup> T cells recovered from  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}\rightarrow Rag^{-/-}$  chimeras (Figure 3D-F). However, despite weaker proliferation of OT-I T cells in  $Rag^{-/-}\rightarrow\beta 2m^{-/-}$  BM chimeras, cells accumulated to the same extent as in  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}\rightarrow Rag^{-/-}$  mice, suggesting that qualitative/quantitative differences in TCR stimulation mediated by MHC I expressing hematopoietic cells and non-hematopoietic cells could probably control survival and/or proliferation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 3E). Surprisingly, the proliferation of OT-I T cells was similar between  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}\rightarrow Rag^{-/-}$  and  $Rag^{-/-}\rightarrow Rag^{-/-}$  chimeras, indicating that optimal HP of CD8<sup>+</sup> T cells is driven largely by MHC I expression on stromal cells (Figure 3D) . Finally, to confirm that expression of MHC I on stromal cells was sufficient for CD8 HP mediated by IL-7 therapy, we treated  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}\rightarrow Rag^{-/-}$  mice with IL-7 and found robust proliferation of OT-I T cells mediated by IL-7 therapy despite lack of MHC I expression by hematopoietic cells (Figure 3B-F). Together, these data confirm that TCR triggering by MHC I DCs is dispensable for HP of

naïve CD8<sup>+</sup> T cells during IL-7 therapy but could be required for optimal persistence of these cells in the periphery (Figure 3B-F).

## CONCLUSION

Several clinical studies have demonstrated that lymphopenia is followed by relatively rapid normalization of CD8<sup>+</sup> T cells through HP, whereas HP of CD4<sup>+</sup> T cells is highly inefficient and chronic CD4 depletion normally persists unless thymic function recovers. During GVHD, DCs and IL-7 concentrations are too low for CD4 HP (Gauthier et al. 2015, submitted) and immune reconstitution of CD4<sup>+</sup> T cells requires not only IL-7 but also factors capable of increasing DC counts. Under these same circumstances, IL-7 therapy alone can restore CD8 HP, indicating that systemic IL-7 levels is probably the limiting factor for regeneration of these cells during GVHD. Our data also indicates that DCs could probably have a more pronounced effect on CD8 survival than proliferation, maybe through IL-15 trans-presentation since HP of CD8<sup>+</sup> T cells is accompanied with phenotypic changes like IL-15R $\beta$  expression (Goldrath et al., 2000; Ramanathan et al., 2009). We also provide substantial evidences that the impact of DCs on HP of CD8<sup>+</sup> T cells is relatively modest, and that MHC I expression by radio-resistant stromal cells is essential for proliferation mediated by IL-7. In addition, we also found that naïve CD8<sup>+</sup> T cells responded to a lower IL-7 concentration compared to CD4<sup>+</sup> T cells. Despite low IL-7 concentrations during GVHD, small fluctuations of this cytokine could have a more pronounced effect on CD8<sup>+</sup> than CD4<sup>+</sup> T cells. Thus, the homeostatic requirement for DCs and IL-7 differs between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and indicates that these cells have their own niche that minimally overlap with each other. Finally, these results also explain why regeneration of CD8<sup>+</sup>

T cells is typically faster than CD4<sup>+</sup> T cells, and this new information should be taken into account before developing targeted therapies aimed at restoring T cells in lymphopenic and GVHD patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Mice and administration of IL-7 or Flt3-ligand.* C57BL/6.SJL (B6.SJL; H-2<sup>b</sup>, Ptpc<sup>a</sup> Pep3<sup>b</sup>, CD45.1<sup>+</sup>), C57BL/6.129S7-Rag1<sup>tmMom/J</sup> (Rag<sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) and (C57BL/6 X DBA2/J) F<sub>1</sub> (B6D2F<sub>1</sub>; H-2<sup>b/d</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). OT-I T cell mice (OT-I; H-2<sup>b</sup>; CD45.2<sup>+</sup>) were provided by Dr. Nathalie Labrecque (Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont). B6.129P2-B2mtm1Unc/J ( $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) and Rag<sup>-/-</sup> X B6.129P2-B2mtm1Unc/J (Rag<sup>-/-</sup> $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>; H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) were provided by Dr. Heather Melichar (Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center). All animals were housed at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal facility and animal studies were performed in accordance with the Maisonneuve-Rosemont Hospital Animal Care Committee. Recombinant human IL-7 (rhIL-7) was supplied by Cytheris Inc. Vehicle (phosphate buffer saline; PBS) or rhIL-7 (5 $\mu$ g) was administered to mice for 6 days as a daily intraperitoneal (i.p.) injection, as described. Recombinant human Flt3-L was purchased from BioXcell and administered daily to mice as an i.p. injection of 10 $\mu$ g for 14 days as described.

*Bone marrow transplantation and GVHD.* On day 0, 1x10<sup>7</sup> T cell depleted BM cells from sex-matched B6.SJL donor mice (H-2<sup>b</sup>) were injected intravenously into lethally irradiated (10Gy) B6D2F<sub>1</sub> recipients (H-2<sup>b/d</sup>) along with 1x10<sup>6</sup> purified B6.SJL T cells (GVHD group) or B6D2F<sub>1</sub>



T cells (syngeneic group) (T cell enrichment kit, StemCell Technologies). Mice were weighed every 3 days and monitored for clinical signs of GVHD. A weight loss of 20% beyond day +14 after transplantation or signs of distress (immobility, arched back, eyes closed) were considered survival end-points entailing euthanasia. For the generation of chimeras, Rag<sup>-/-</sup> or β2m<sup>-/-</sup> recipient mice received intravenously 1x10<sup>7</sup> BM cells from Rag<sup>-/-</sup> or Rag<sup>-/-</sup>β2m<sup>-/-</sup> donor mice. Rag<sup>-/-</sup> mice receiving Rag<sup>-/-</sup>β2m<sup>-/-</sup> BM were treated with anti-NK1.1 (PK136, BioxCell, 200μ/mice) at days -2 and -1 before bone marrow transplantation. Six weeks later, hematopoietic cells of chimeric mice were considered fully regenerated.

*CTV staining and adoptive transfer of lymphocytes.* Spleen and LN from OT-I mice were homogenized and lymphocytes enriched by negative selection (T cell enrichment kit, StemCell Technologies). Enriched T cells were suspended at 1x10<sup>7</sup> cells/ml in PBS and incubated for 15 min at room temperature with 1 μl/ml of 5 mM CTV (Cell Trace Violet, Invitrogen). Cells were washed twice in PBS and recipient mice received 1x10<sup>6</sup> CTV-labeled T cells by i.v. injection. After 7 days, mice were sacrificed and CTV content was analyzed with a Fortessa flow cytometer (BD Bioscience). FlowJo software (TreeStar) was used for all analysis.

*Flow cytometry.* Cells were resuspended at a density of 1x10<sup>7</sup> cells/ml in FACS buffer and were incubated 30 min on ice with diluted monoclonal antibodies and then washed and resuspended in FACS buffer for immediate analysis. The following monoclonal antibodies were used from BioLegend : PE-anti-Vα2 (clone), APCCy7- and APC-anti-CD4 (GK1.5); PeCy7-anti-CD8 (53-2.7); PerCPCy5.5-anti-CD45.1 (A20); PE- and FITC-anti-CD11c (N418); PerCPCy5.5-anti-CD11b (M1/70); FITC-anti-TCRβ (H57-597); APC-anti-H2-K<sup>d</sup> (SF1-1.1); APCCy7-anti I<sub>A</sub>E

(M5/114.15.2); PE-anti H2-K<sup>b</sup> (AF6-88.5). From BD Biosciences: PE-anti-Stat5 (47/Stat5(pY694)).

*pSTAT5 staining.* For in vitro detection of phosphorylated STAT5, cells were stimulated for 30 minutes with different concentrations of rhIL-7. Then cells were fixed in hot (37°C) lyse/fix buffer, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and made permeable in iced Perm Buffer III (BD Biosciences). Cells were then stained for pSTAT5 and surface receptors.

*Statistical analysis.* Prism 5.0 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare pairs of data and the Kruskal Wallis test was used to compare more than 3 data. A p-value less than or equal to 0.05 was considered significant. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Mrs Myriam Bareille for mice husbandry. We also thank Cytheris for providing rhIL-7. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research to M.G; S-D.G. received a scholarship from Fond de la Recherche du Québec en Santé.

## **AUTHORSHIP**

S-D.G. did most of the experiments, designed the experiments and wrote the manuscript. D.L did experiments and revised the manuscript. M.G. provided intellectual input and research support and wrote the manuscript. The authors declare that they have no competing interests.

## REFERENCES

1. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *The Lancet* 373, 1550–1561 (2009).
2. Servais, S. et al. Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 20, 507–517 (2014).
3. Chang, Y.-J. et al. Immune Reconstitution Following Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Transplantation Compared with HLA-Identical Sibling Transplantation. *J. Clin. Immunol.* 32, 268–280 (2012).
4. Bosch, M., Khan, F. M. & Storek, J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 324–335 (2012).
5. Mackall, C. et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* 44, 457–462 (2009).
6. Dulude, G., Roy, D. C. & Perreault, C. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J. Exp. Med.* 189, 1329–1342 (1999).
7. Gorski, J. et al. Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood* 109, 5502 – 5510 (2007).
8. Labrecque, N. et al. How much TCR does a T cell need? *Immunity* 15, 71–82 (2001).
9. Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J. & Surh, C. D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, 173–181 (1999).

10. Lantz, O., Grandjean, I., Matzinger, P. & Di Santo, J. P.  $\gamma$  chain required for naïve CD4<sup>+</sup> T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat. Immunol.* 1, 54–58 (2000).
11. Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W. & Thompson, C. B. IL-7 enhances the survival and maintains the size of naïve T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6869–6876 (2001).
12. Goldrath, A. W. & Bevan, M. J. Low-Affinity Ligands for the TCR Drive Proliferation of Mature CD8<sup>+</sup> T Cells in Lymphopenic Hosts. *Immunity* 11, 183–190 (1999).
13. Napolitano, L. A. et al. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1–mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.* 7, 73–79 (2001).
14. Tan, J. T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8732–8737 (2001).
15. Goldrath, A. W. et al. Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naïve and Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.* 195, 1515–1522 (2002).
16. Guimond, M., Fry, T. J. & Mackall, C. L. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 28, 289–294 (2005).
17. Hennion-Tscheltzoff, O. et al. TCR triggering modulates the responsiveness and homeostatic proliferation of CD4<sup>+</sup> thymic emigrants to IL-7 therapy. *Blood* 121, 4684–4693 (2013).
18. Gruber, A. & Brocker, T. MHC Class I-Positive Dendritic Cells (DC) Control CD8 T Cell Homeostasis In Vivo: T Cell Lymphopenia as a Prerequisite for DC-Mediated Homeostatic Proliferation of Naïve CD8 T Cells. *J. Immunol.* 175, 201–206 (2005).

19. Zaft, T., Sapoznikov, A., Krauthgamer, R., Littman, D. R. & Jung, S. CD11<sup>high</sup> Dendritic Cell Ablation Impairs Lymphopenia-Driven Proliferation of Naive and Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 175, 6428–6435 (2005).
20. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrançois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 1, 426–432 (2000).
21. Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y. & Bevan, M. J. Naive T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-Driven Proliferation. *J. Exp. Med.* 192, 557–564 (2000).
22. Ramanathan, S. et al. Cytokine synergy in antigen-independent activation and priming of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 219–239 (2009).

## FIGURE LEGENDS

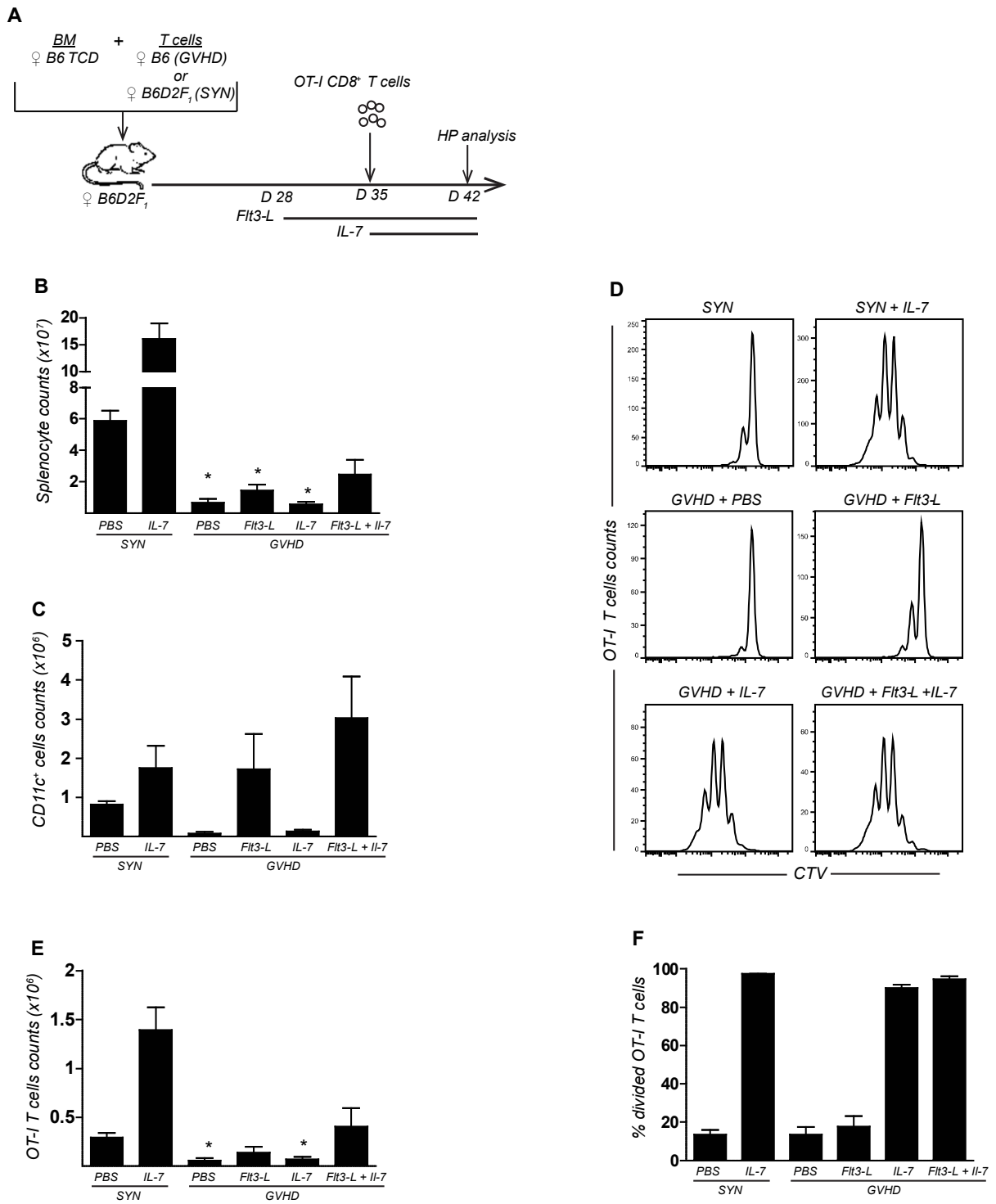
**Figure 1. Interleukin-7 therapy alone can restore naïve CD8 HP during GVHD. (A)** Irradiated wild-type ♀ B6D2F<sub>1</sub> mice received  $1 \times 10^7$  BM cells from ♀ B6.SJL mice with  $1 \times 10^6$  B6.SJL (GVHD) or ♀ B6D2F<sub>1</sub> (syngeneic) purified splenic T cells. Twenty-eight days later, mice were treated with Flt3-L for 14 consecutive days. At day +35, mice received  $1 \times 10^6$  CTV-labeled OT-I T cells. Mice were then treated with daily IL-7 injections. At day +42, mice were sacrificed and CD4<sup>+</sup> T cell HP was evaluated by flow cytometry. **(B)** Splenocytes count in GVHD and syngeneic hosts 42 days post-allo-SCT. **(C)** Absolute counts of splenic CD11c<sup>+</sup> cells at day +42 post-allo-SCT. **(D)** OT-I T cell proliferation 7 days after transfer into GVHD or syngeneic animals. **(E)** Absolute counts of OT-I T cells in GVHD and syngeneic hosts 7 days after transfer. **(F)** Percentage of divided OT-I T cells 7 days after transfer. Data are representative of 2 independent experiments, 3 mice per group. Results show mean +/- s.e.m. P-values were determined by a Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn's test (compared to BMT, \* $p \leq 0,05$ ).

**Figure 2. CD8<sup>+</sup> T cells are more sensitive to IL-7 than CD4<sup>+</sup> T cells. (A)** STAT5 phosphorylation in CD8<sup>+</sup> (dark line) vs CD4<sup>+</sup> (dashed line) T cells exposed to varying concentrations of rhIL-7. **(B)** Representative flow cytometry analysis of proliferation of CD8<sup>+</sup> vs CD4<sup>+</sup> T cells recovered 7 days after transfer into IL-7-treated WT mice. Data are representative of 1 independent experiment, 3 mice per group.

**Figure 3. MHC I expression by non-hematopoietic cells is sufficient for CD8 HP mediated by IL-7 therapy. (A)** Irradiated ♀  $Rag^{-/-}$  or  $\beta 2m^{-/-}$  mice received  $1 \times 10^7$  BM cells from ♀  $Rag^{-/-}$  mice. Eight weeks later, recipient mice received  $1 \times 10^6$  CTV-labeled OT-I T cells and HP was evaluated 7 days later by flow cytometry. **(B)** Irradiated ♀  $Rag$  mice received  $1 \times 10^7$  BM cells from ♀  $Rag^{-/-}\beta 2m^{-/-}$  mice. Eight weeks later, recipient mice received  $1 \times 10^6$  CTV-labeled OT-I T cells and were treated with daily PBS or IL-7 injections for 7 days. HP was then evaluated by flow cytometry. **(C)** Splenocytes count in groups described in (A) and (B). **(D)** OT-I T cell proliferation 7 days after transfer into chimeras described in (A) and (B). **(E)** Absolute count of OT-I T cells 7 days after transfer. **(F)** Percentage of divided OT-I T cells 7 days after transfer. Data are representative of 1 independent experiments, 3 mice per group. Results show mean  $\pm$  s.e.m.

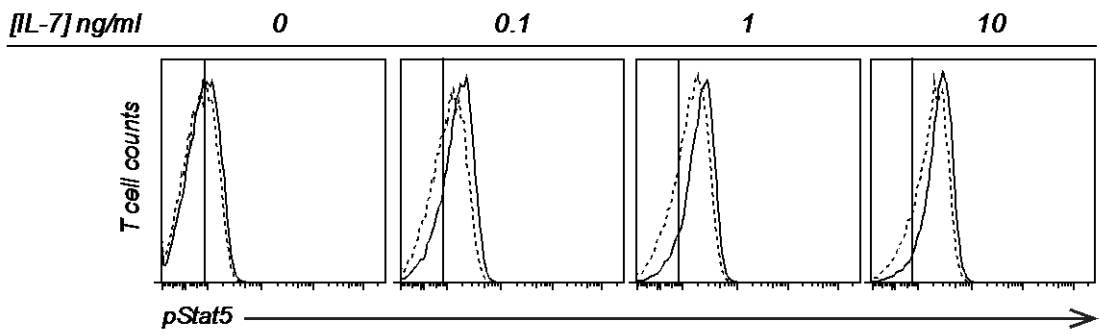


**Figure 1**

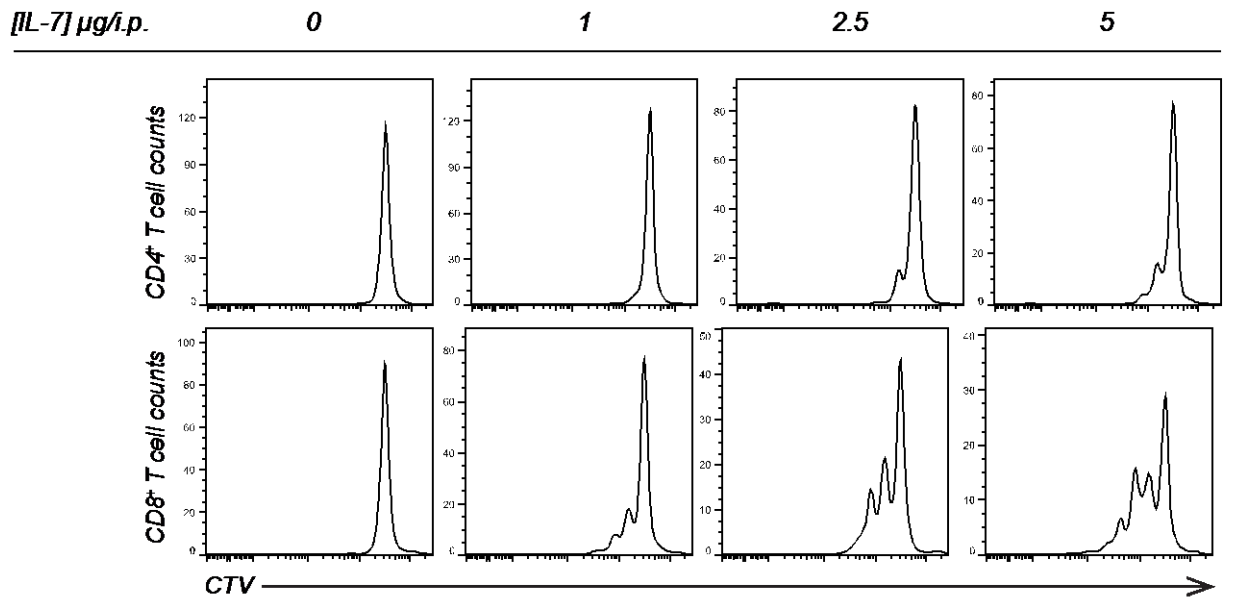


**Figure 2**

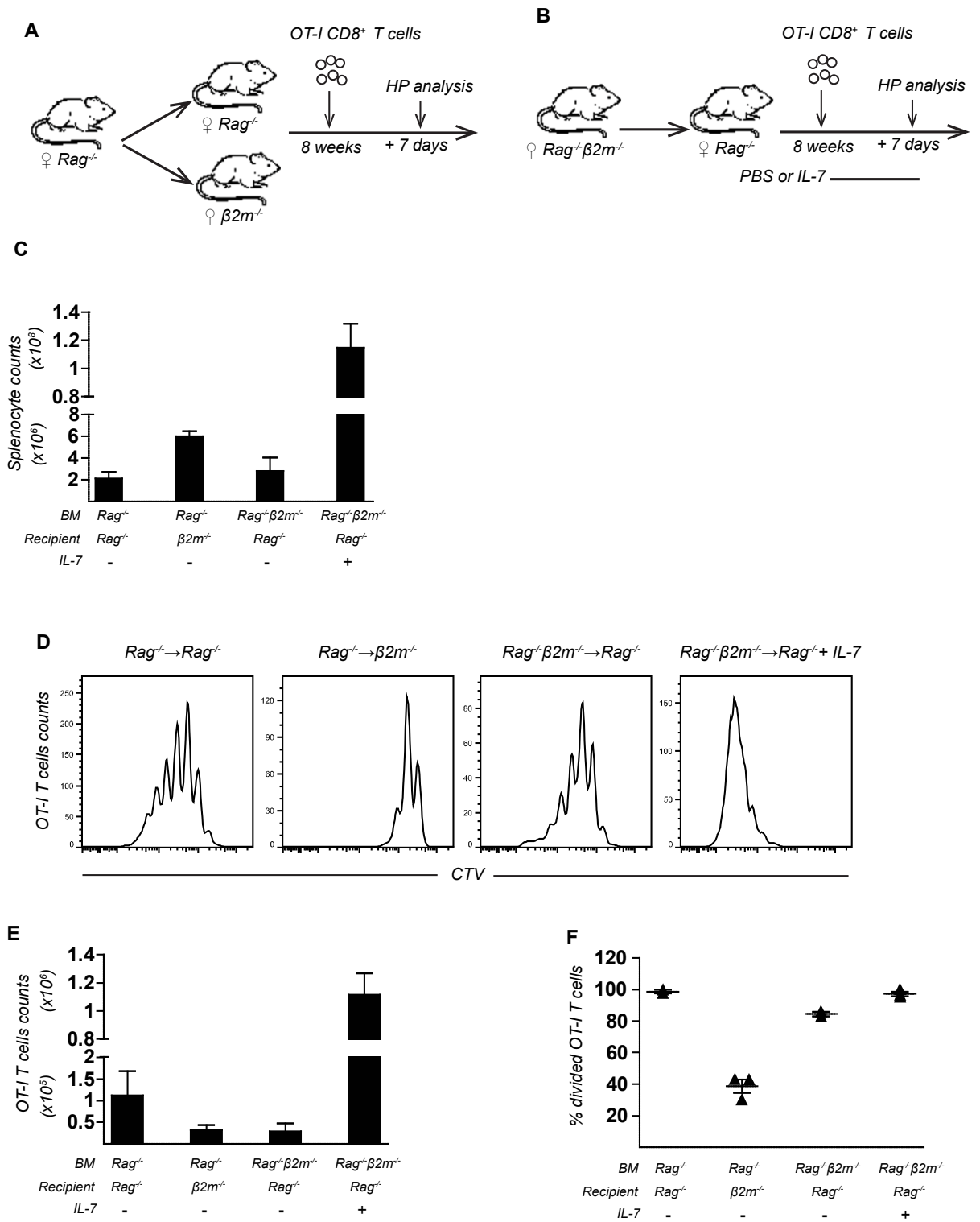
**A**



**B**



**Figure 3**



## **Chapitre 4: Discussion**

L'objectif principal de cette thèse était de mieux comprendre l'impact de la GVHD sur la reconstitution des LT après une ASCT. Dans les chapitres 2 et 3, nous avons établi que la GVHD nuit considérablement à la reconstitution de ces cellules en affectant la régénération des DC ainsi que la production d'IL-7, deux facteurs importants dans l'homéostasie des LT. Toutefois, ces observations ont révélé des différences fondamentales entre les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au niveau de leur besoin respectif pour proliférer homéostatiquement. De plus, nos résultats laissent à penser que le SDF-1 $\alpha$  pourrait jouer un rôle thérapeutique en régulant la gravité de la GVHD.

## 4. Reconstitution immunitaire des lymphocytes T et des cellules dendritiques

### 4.1. Reconstitution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs

L'objectif de l'article 1 était de mieux comprendre le (ou les) mécanisme(s) par lequel la GVHD empêche la reconstitution des LTn CD4<sup>+</sup> non-alloréactifs. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un modèle classique de greffe de moelle osseuse chez la souris, le modèle parent dans F<sub>1</sub>, dans lequel nous avons greffé des souris B6D2F<sub>1</sub> (H-2<sup>b/d</sup>) avec de la MO de souris B6.IL-7R $\alpha^{-/-}$  (H-2<sup>b</sup>) combinée à des LT B6.SJL (H-2<sup>b</sup>, alloréactifs dans notre modèle) ou LT B6D2F<sub>1</sub> (H-2<sup>b/d</sup>, syngéniques dans notre modèle) (Article 1, figure 1A). Afin d'évaluer la PH des LTn CD4<sup>+</sup> non-alloréactifs, nous avons transféré dans nos souris greffées des LTn CD4<sup>+</sup> anti-HY monoclonaux marqués au *Cell Trace Violet* (CTV). L'utilisation de LT polyclonaux afin d'évaluer la PH des LTn CD4<sup>+</sup> est impossible dans notre modèle puisque certains de ces lymphocytes pourraient s'activer contre les antigènes du receveur, empêchant toute étude sur la PH. À l'inverse, les LT CD4<sup>+</sup> anti-HY ne s'activent qu'en présence d'antigène mâle (HY), absent dans notre modèle de greffe n'utilisant que des souris femelles, ce qui nous assure que la prolifération observée n'est pas due à leur activation. De plus, les LT CD4<sup>+</sup> anti-HY sont de même fond génétique que le donneur (B6, H-2<sup>b</sup>) et tolérés par le receveur (B6D2F<sub>1</sub>, H-2<sup>b/d</sup>), ce qui les empêche d'être directement éliminés.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la PH des LTn est induite dans un contexte de lymphopénie lorsque les ressources homéostatiques, c'est-à-dire l'IL-7 et la présentation psCMH, sont facilement accessibles (Takada and Jameson, 2009a). Cependant, la PH des LTn CD4<sup>+</sup> est beaucoup moins efficace que celle des LTn CD8<sup>+</sup> (Guimond et al., 2009; Min et al., 2005). Guimond et al ont démontré que cette observation pouvait s'expliquer par l'effet de l'IL-7 sur les DC exprimant l'IL-7R $\alpha$ . Dans un contexte de lymphopénie, les niveaux élevés d'IL-7 pourraient être responsables de la réduction de l'expression du CMH II à la surface de ces DC,

entraînant la diminution de la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. D'ailleurs, l'abrogation de la signalisation de l'IL-7 dans les DC (souris IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup>) permet l'expression du CMH II et le retour de la PH des CD4<sup>+</sup> (Guimond et al., 2009).

En lien avec ces observations, l'hypothèse au début de ce projet était que les niveaux élevés d'IL-7, associés à la lymphopénie causée par la GVHD, entraînaient une diminution de l'expression du CMH II sur les DC du donneur générées après la greffe et, par conséquent, diminuaient l'efficacité de la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. L'utilisation de MO IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> permettrait donc la régénération de DC affranchies de la signalisation de l'IL-7, ce qui rétablirait la reconstitution des LT CD4<sup>+</sup>. Malheureusement, la PH des LT CD4<sup>+</sup> anti-HY n'a pas pu être restaurée dans les souris en GVHD malgré l'utilisation de MO IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Article 1, figure 1E et F).

Dulude et al ainsi que Gorski et al ont démontré que l'absence de PH des LT est due à l'environnement de la GVHD (Dulude et al., 1999; Gorski et al., 2007). En effet, des LT isolés à partir de souris sauvages (WT) et non-réactifs à l'hôte ne peuvent pas proliférer lorsqu'ils sont transférés dans une souris en GVHD. À l'inverse, les LT isolés d'un hôte en GVHD ont la capacité de proliférer lorsqu'ils sont transférés dans un receveur secondaire sans GVHD. Ce constat s'applique également à nos résultats puisque les LT anti-HY isolés de nos souris en GVHD et transférés dans une souris IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup> peuvent à nouveau proliférer (Article 1, Figure 1E). Ces résultats indiquent que l'absence de PH des LTn CD4<sup>+</sup> n'est pas due à un défaut intrinsèque de ces cellules mais bien à l'environnement dans lequel elles se trouvent, et plus particulièrement à un défaut de la niche périphérique à soutenir leur PH.

Mis à part le défaut de prolifération, il a été également observé que les LT non-réactifs à l'hôte pouvaient exprimer la molécule Fas et ainsi être éliminés de manière non-spécifique par les LT alloréactifs exprimant Fas-ligand (Brochu et al., 1999). Ce mécanisme pourrait être également responsable du faible nombre de LT anti-HY récupérés après transfert. De plus, l'absence de signaux homéostatiques pourrait également entraîner l'apoptose des LT transférés dans un hôte en GVHD. Pour évaluer ce point, il aurait été possible dans notre modèle de vérifier par cytométrie en flux l'expression de Fas à la surface des LT anti-HY ainsi que la proportion de cellules en apoptose par les marqueurs Annexine V/7-AAD.

À partir de ces résultats, notre prochaine étape a été d'étudier la fonctionnalité de la niche périphérique qui soutient l'homéostasie des LTn CD4<sup>+</sup>, c'est-à-dire les niveaux d'IL-7 et la régénération des DC.

## 4.2. Interleukine-7 et GVHD

L'IL-7, à part dans des conditions de lymphopénie, se retrouve en très faible concentration dans le sang de souris sauvage (10pg/ml) et est difficilement quantifiable par ELISA dû à la limite de détection des outils disponibles (Guimond et al., 2009). Nous avons donc décidé dans un premier temps de mesurer l'expression de l'ARNm de l'IL-7 dans le stroma de la rate et de la MO de nos souris greffées. Dans les deux cas, l'ARNm de l'IL-7 était plus faible dans le stroma des souris en GVHD (Article 1, figure 2D). Cependant Guimond et al ont démontré que la production d'IL-7 est soumise à une boucle de régulation négative et que la faible quantité d'ARNm pourrait plutôt refléter une forte concentration d'IL-7. Nous avons donc entrepris de mesurer l'expression de l'IL-7R $\alpha$  à la surface de LT CD4<sup>+</sup> anti-HY transférés 24h dans les souris greffées. Cette mesure qualitative se base encore sur le principe de la boucle de régulation de l'IL-7, une forte concentration d'IL-7 entraînant la diminution de l'expression de l'IL-7R $\alpha$ , et vice versa (Park et al., 2004). L'expression de l'IL-7R $\alpha$  était beaucoup plus forte à la surface des LT transférés dans les souris en GVHD que les souris contrôles (Article 1, figure 2E). Ces deux résultats nous ont permis de confirmer qu'un mois post-greffe, les niveaux d'IL-7 sont bas dans les souris en GVHD. Cette conclusion diffère de celle faite chez l'humain. En effet, plusieurs études concluent qu'après une augmentation temporaire de sa concentration, l'IL-7 retourne à des valeurs normales dans les mois qui suivent la greffe (De Bock et al., 2013; Dean et al., 2008; Kielsen et al., 2015; Thiant et al., 2010). Une des raisons pouvant expliquer cette différence est le type d'ASCT (CMH-compatible vs incompatible), le type de régimes de préparation employés (myéloablatif vs régime réduit) ainsi que la gravité de la GVHD qui en résulte. On peut également questionner la sensibilité des kits ELISA, sachant qu'on mesure des niveaux basaux d'IL-7 d'environ 10pg/ml, ce qui se situe dans les limites de détection de cette cytokine. Quoi qu'il en soit, conclure que la concentration d'IL-7 revienne à des valeurs normales alors que les patients sont gravement lymphopéniques est paradoxal (Bolotin et al.,

1999; Napolitano et al., 2001). Nos résultats, ainsi que ceux chez l'humain, semblent plutôt indiquer un défaut de production d'IL-7. Il reste à déterminer s'il s'agit d'un défaut intrinsèque des cellules stromales produisant cette cytokine, ou l'absence de ces cellules. Nous aurions pu tenter de vérifier la présence des cellules stromales dans les ganglions lymphatiques de nos souris ( $CD45^-gp38^+CD31^-$  pour les CFR et  $CD45^-gp38^+CD31^+$  pour les CEL) bien que cela aurait été difficile dû à la lymphopénie et aux dommages causés à ces organes par la GVHD.

### 4.3. Reconstitution des cellules dendritiques

En plus de la découverte d'un boucle de régulation de l'IL-7, Guimond et al ont démontré que la PH des LTn  $CD4^+$  nécessite l'expression commune du CMH II et de l'IL-7 par une même DC (Guimond et al., 2009). D'ailleurs, l'élimination des DC par traitement à la toxine diphtérique dans des souris B6D2F<sub>1</sub> greffées avec de la MO de souris  $CD11cDTR.IL-7R\alpha^{-/-}$  entraîne la perte de la PH des LTn  $CD4^+$  (Article 1, figure 2C). Transposée à l'ASCT, cette observation laisse à penser que la présence des DC est nécessaire afin de permettre la reconstitution des LTn  $CD4^+$ . En analysant les DC retrouvées dans la rate, nous avons découvert que leur nombre était grandement diminué dans nos souris en GVHD comparativement aux souris contrôles (Article 1, figure 2A et B). Ceci n'était pas dû à l'absence de l'IL-7R $\alpha$  sur les cellules hématopoïétiques puisque nous avons observé le même résultat suite à une greffe de MO de souris Rag $^{-/-}$  ou B6 (Article 1, figure supplémentaire S1 E-G). Cette observation a d'ailleurs été faite à plusieurs reprises chez l'humain (tableau II) et bien qu'aucune étude n'ait analysé une corrélation potentielle entre la régénération défectueuse des DC et le nombre de LTn  $CD4^+$  chez les patients greffés, plusieurs travaux ont établi une corrélation entre le faible nombre de DC et la diminution de la survie, l'augmentation de la GVHD ainsi que l'augmentation des cas d'infections post-greffe (Mohty et al., 2004; Peric et al., 2015; Rajasekar et al., 2008; Reddy et al., 2004).

À partir de ces données, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer l'absence de DC dans nos souris en GVHD. La première est que les DC, une fois générées, sont éliminées par les LT



alloréactifs. La deuxième est que l'absence des DC est due à un défaut de différenciation des progéniteurs au niveau de la MO.

### **4.3.1. Les cellules dendritiques du donneur sont éliminées par les lymphocytes T alloréactifs**

Il est bien connu que suite à leur activation, les LT effecteurs CD8<sup>+</sup>, et dans une moindre mesure les LT effecteurs CD4<sup>+</sup>, peuvent éliminer les DC présentant l'antigène spécifique (Chen et al., 2012; Guarda et al., 2007; Loyer et al., 1999; Yang et al., 2006). Ce mécanisme permettrait de contrôler la réponse immunitaire et la durée de l'inflammation. D'autre part, plusieurs études ont démontré le rôle important des DC du donneur dans le maintien de la GVHD après l'ASCT (Markey et al., 2009; Matte et al., 2004; Wang et al., 2011). Ceci est possible grâce à la présentation croisée des allo-antigènes aux LT alloréactifs CD8<sup>+</sup> mais également par le transfert de complexes peptide-CMH I des cellules de l'hôte aux DC du donneur (Wang et al., 2011). Il est donc possible qu'après la présentation d'allo-antigènes aux LT alloréactifs, les DC du donneur soient éliminées par ceux-ci. Afin d'évaluer ce mécanisme dans notre modèle, nous avons effectué un test de cytotoxicité *in vivo* en transférant dans nos souris en GVHD des DC du donneur générées dans le receveur (DC<sup>B6→B6D2F1</sup>) en combinaison avec des DC du donneur (DC<sup>B6</sup>) (Article 1, figure 3A). L'hypothèse ici était que les DC<sup>B6→B6D2F1</sup> présenteraient par présentation croisée ou par échange de molécules membranaires (trogocytose) des antigènes ou des complexes peptide-CMH du receveur et qu'elles seraient éliminées par les LT alloréactifs suite à leur transfert dans les souris en GVHD. À l'inverse, les DC<sup>B6</sup> isolées directement du donneur ne présenteraient pas ces allo-antigènes et seraient préservées. Effectivement, nous avons retrouvé moins de DC<sup>B6→B6D2F1</sup> comparé aux DC<sup>B6</sup> dans la rate des souris en GVHD 36h après leur transfert (Article 1, figure 3B). Bien qu'ils appuient notre hypothèse, nos résultats ne démontrent pas hors de tout doute que les DC sont éliminées par les LT alloréactifs durant la GVHD. Nous aurions pu réaliser des expériences de cytotoxicité *in vitro*, en mettant directement en contact les DC et les LT alloréactifs, ou sinon répéter le transfert *in vivo* mais après élimination des LT et retrouver dans ce cas des nombres similaires de DC. Par contre, le fait que l'on retrouve davantage de DC<sup>B6</sup> permet de réfuter l'hypothèse d'une élimination non-

spécifique. À partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que si les DC étaient éliminées par les LT alloréactifs, alors l'élimination de ceux-ci permettrait la régénération des DC du donneur après la greffe. De façon surprenante, nous n'avons jamais retrouvé des nombres normaux de DC après l'élimination des LT dans les souris en GVHD et ce même sept mois après traitement, indiquant que l'élimination des DC par les LT alloréactifs n'est pas le facteur principal qui limite la régénération des DC dans un contexte de GVHD (Article 1, figure 3C et Annexe figure 1). Ceci nous a amené à nous pencher sur notre deuxième hypothèse.

#### **4.3.2. L'absence des cellules dendritiques est due à un défaut de différenciation des progéniteurs au niveau de la MO.**

Comme l'élimination des LT alloréactifs n'a pas permis de régénérer les DC post-greffe, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de ces cellules découlait d'un défaut de différenciation des cellules progénitrices au niveau de la MO. Nous avons donc analysé le nombre de progéniteurs communs de DC (CDP) dans la MO des souris greffées et avons effectivement observé une diminution de ces progéniteurs dans les souris en GVHD comparé aux souris contrôles (Article 1, figure 4A). En lien avec ce résultat, la mise en culture *in vitro* de cellules de MO de souris en GVHD avec du Flt3-L génère des DC, mais en plus faible nombre, suggérant que qu'il y a effectivement moins de CDP dans la MO mais que ceux-ci détiennent encore la capacité de se différencier en DC (Article 1, figure 4B). D'ailleurs, des receveurs secondaires greffés avec la MO de souris en GVHD soutiennent la PH des LTn CD4<sup>+</sup> deux mois après la greffe (Annexe figure 2). Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'absence de régénération des DC n'est pas due à un défaut intrinsèque des CDP mais plutôt à un défaut du milieu à soutenir leur survie et/ou leur différenciation.

La MO est composée de cellules stromales formant une niche hématopoïétique nécessaire au maintien et à la différenciation des CSH (Anthony and Link, 2014). Ces cellules stromales produisent des facteurs de croissances qui permettent la différenciation des progéniteurs en cellules de lignée spécifique. Entre autres, il est connu que le Flt3-L joue un rôle crucial dans le maintien et la différenciation des progéniteurs en DC (Maraskovsky et al., 1996; McKenna et

al., 2000; Pulendran et al., 1997). Nous avons donc émis l'hypothèse que la GVHD affectait la production de Flt3-L, causant l'absence de différenciation des CDP en DC. Malgré une diminution de l'ARNm de Flt3-L dans les cellules stromales de la MO nous n'avons pas observé de différence dans les concentrations de ce facteur de croissance dans le sang des souris en GVHD et contrôles, indiquant que l'absence de développement des DC n'est certainement pas le résultat d'un défaut de production de Flt3-L. Il est connu que les LT à l'état basal et activés peuvent produire du Flt3-L suite à une aplasie médullaire (Chklovskaja et al., 1999, 2001; Saito et al., 2013). Il aurait été intéressant dans notre modèle de mesurer les niveaux de Flt3-L suite à l'élimination des LT alloréactifs. Peut-être dans ce cas aurions-nous observé une diminution des niveaux de Flt3-L dans les souris en GVHD.

Comme les niveaux de Flt3-L semblaient normaux dans les souris en GVHD, nous nous sommes intéressés aux autres facteurs pouvant influencer le développement des DC dans la MO. Comme mentionné dans l'introduction, le GM-CSF ne semble pas réguler le développement des DC des organes lymphoïdes (Greter et al., 2012; King et al., 2010; Kingston et al., 2009; Maraskovsky et al., 1996; Vremec et al., 1997). De même, la LT $\beta$  ne semble que requise en périphérie pour réguler l'homéostasie des DC CD11b<sup>+</sup> (Kabashima et al., 2005; Wang et al., 2005; Wu et al., 1999). Kohara et al ont découvert que le SDF-1 $\alpha$ , produit par les cellules stromales de la MO, était un régulateur clé du développement des DC (Kohara et al., 2007). En effet, la suppression du récepteur de SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, à la surface des progéniteurs entraîne une diminution importante du nombre de pDC et cDC dans la MO et la rate, mais également une diminution de leurs progéniteurs dans la MO (CLP Flt3<sup>+</sup> et CMP Flt3<sup>+</sup> mais pas LSK Flt3<sup>lo</sup>). En s'appuyant sur les résultats de cet article, nous avons décidé d'analyser l'expression du SDF-1 $\alpha$  dans nos souris greffées. Comparé aux souris contrôles, nous avons découvert que les niveaux d'ARNm de SDF-1 $\alpha$  étaient beaucoup plus faible dans les cellules stromales de la MO et de la rate des souris en GVHD (Article 1, figure 4F). De plus, les niveaux systémiques de SDF-1 $\alpha$  étaient plus faibles dans le sang des animaux atteints de GVHD, suggérant une diminution globale de la production de SDF-1 $\alpha$  (Article 1, figure 4H). De façon intéressante, l'expression de CXCR4 à la surface des cellules Lin<sup>-</sup> de la MO était similaire entre souris malades et contrôles, démontrant encore une fois que le milieu, dans ce cas-ci la niche hématopoïétique, et non les CSH en tant que telles, serait affectée par la GVHD (Article 1, figure 4G).

#### 4.4. Dommages à la niche hématopoïétique durant la GVHD

Le Flt3-L et le SDF-1 $\alpha$  sont produits principalement par les cellules stromales de la MO (Nagasawa, 2014; Wodnar-Filipowicz, 2003). Or, nous avons démontré que l'ARNm de ces deux facteurs est diminué dans ces cellules. Ceci nous amène à nous questionner sur l'impact de la GVHD sur les cellules stromales qui résident dans la MO (von Bonin and Bornhäuser, 2014).

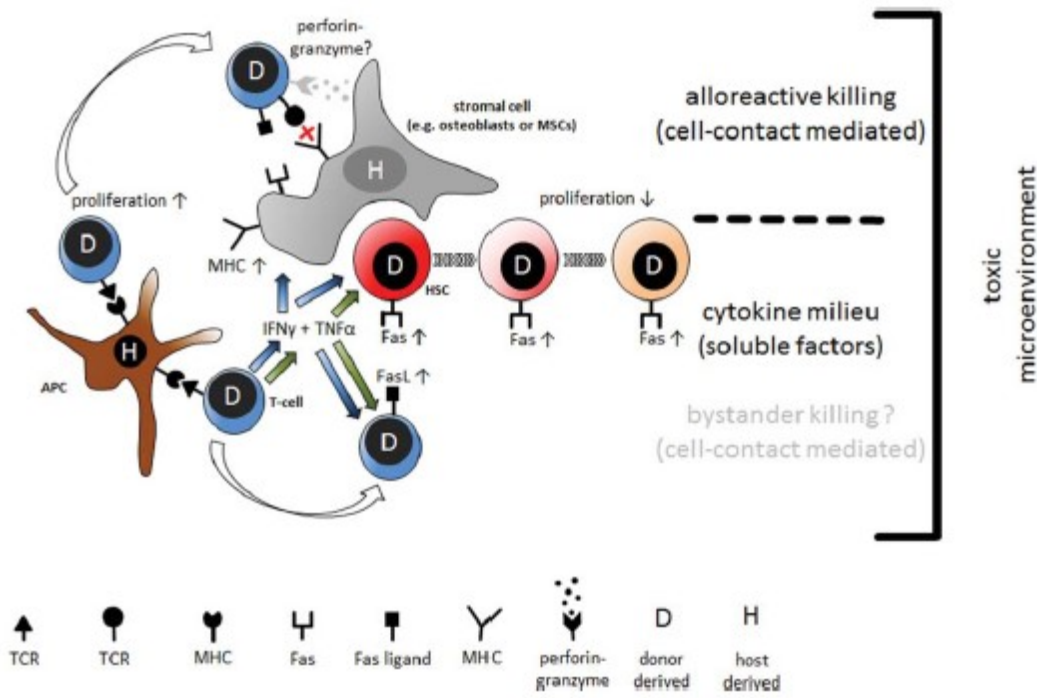
Une niche hématopoïétique est considérée comme un site au sein de la MO dans lequel les CSH peuvent s'auto-renouveler ou se différencier en cellules matures (Anthony and Link, 2014; Boulais and Frenette, 2015). La niche est composée de plusieurs types de cellules stromales qui régulent l'hématopoïèse, chaque type pouvant réguler de manière distincte les progéniteurs hématopoïétiques.

Il est bien connu que la lymphopoïèse B est particulièrement atteinte lors de la GVHD (Baker et al., 1997; Garvy et al., 1993; Mensen et al., 2014; Shono et al., 2010). Curieusement, plusieurs études ont démontré le rôle crucial du SDF-1 $\alpha$  dans la lymphopoïèse B en plus du développement des DC (Nagasawa et al., 1996; Tokoyoda et al., 2004). Comme la régénération de ces deux types cellulaires est restreinte après la greffe, on peut émettre l'hypothèse qu'un type de cellules stromales exprimant le SDF-1 $\alpha$  est affecté par la GVHD.

Plusieurs types de cellules stromales peuvent produire du SDF-1 $\alpha$ . Trois sous-types de cellules stromales périvasculaires l'expriment fortement: les *CXCL12-abundant reticular cells* (CAR), les cellules stromales nestine<sup>+</sup> et les cellules stromales positives pour le récepteur à la leptine (*Leptin receptor*, LepR<sup>+</sup>). En éliminant spécifiquement le SDF-1 $\alpha$  dans certains de ces sous-types, deux études ont démontré que les cellules CAR et LepR<sup>+</sup> étaient essentielles pour la rétention des CSH dans la MO (Ding and Morrison, 2013). Les cellules stromales mésenchymales (*Mesenchymal Stromal cells*, MSC) expriment également le SDF-1 $\alpha$  (Greenbaum et al., 2013). D'ailleurs, la suppression de SDF-1 $\alpha$  dans ces cellules affecte autant la rétention des CSH dans la MO que leur fonctionnalité. Finalement, il semble que les cellules

CAR représentent la niche essentielle au développement des lymphocytes B (Greenbaum et al., 2013)

L'impact de la GVHD sur les cellules stromales de la MO est encore peu documenté. De manière générale, la GVHD est associée à une myélosuppression sévère après l'ASCT (van Dijken et al., 1991; Martinez-Jaramillo et al., 2001; Shono et al., 2010) (Article 1, figure supplémentaire 2A). Il a été démontré que les CSH du donneur pouvaient être éliminées de manière non spécifique par les LT alloréactifs. Cette action se ferait principalement par la voie Fas-FasL et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  (Bloom et al., 2004; Bruin et al., 2013; Chen et al., 2004; Delisle et al., 2008; Mori et al., 1998) (Figure 4.1). Cependant, l'inhibition de la voie Fas-FasL ne permet pas de renverser la myélosuppression (Shono et al., 2010). De plus, d'autres études en plus de la nôtre démontrent que l'immunosuppression après le déclenchement de la GVHD ne permet pas de restaurer l'hématopoïèse, indiquant que la myélosuppression résulte avant tout des dommages causés aux cellules stromales qui perdurent à long terme ou sont possiblement irréversibles (Bloom et al., 2004; Shono et al., 2010) (Article 1, figure 3C et Annexe figure 1). D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence que les cellules stromales étaient diminuées chez les hôtes en GVHD (Chen et al., 2005; Shono et al., 2014; Yao et al., 2014) (Article 1, figure supplémentaire 2). Ceci pourrait être dû à la reconnaissance directe des cellules stromales par les LT alloréactifs puisqu'il a été démontré que ces cellules pouvaient exprimer le CMH dans des contextes d'inflammation (Faßlrunner et al., 2012; Malhotra et al., 2012) (Figure 4.1). Finalement, les cellules CAR, qui semblent nécessaires à la lymphopoïèse B, sont situées dans l'endosteum, une région de l'os très vascularisée (Kunisaki et al., 2013; Sugiyama et al., 2006). Cette localisation pourrait favoriser leur élimination par les LT alloréactifs provenant de la périphérie durant la GVHD.



**Figure 4.1 : Modèle de myélosuppression induite par la GVHD.** Les LT du donneur (D), une fois activés par les APC de l’hôte (H), peuvent migrer dans la MO et relâcher des cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) qui peuvent affecter la fonction des cellules stromales ou l’homéostasie des CSH du donneur. Les LT alloréactifs peuvent également éliminer les cellules par la voie FasL et/ou possiblement par relâche de perforine/granzyme de manière CMH indépendante ou dépendante. Tiré de von Bonin and Bornhäuser, 2014.

Dans un contexte normal, il existe plusieurs autres facteurs produits par les cellules stromales qui sont impliqués dans l’homéostasie des CSH et dont la production pourrait être également altérée durant la GVHD (Boulais and Frenette, 2015). Des chercheurs ont découvert que le *stem cell factor* (SCF), comme le SDF-1 $\alpha$ , est principalement exprimé par les cellules stromales périsvasculaire de l’os et sa suppression dans les cellules endothéliales ou LepR<sup>+</sup> entraîne la perte des CSH (Ding et al., 2012). Cependant aucune étude n’a été entreprise sur le SCF au niveau de la MO après une ASCT. Les cellules endothéliales de la MO expriment Jagged-1, le ligand du récepteur Notch exprimé par les CSH, et semblent soutenir leur auto-renouvellement (Butler et

al., 2010). Malheureusement, la grande majorité des études faites sur Notch dans un contexte d'ASCT portent sur son rôle dans l'activation des LT alloréactifs ou son utilisation *ex vivo* pour l'expansion des cellules (Ebens and Maillard, 2013). Finalement, il a été révélé que l'angiopoïétine-1 et *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) sont impliquées dans la quiescence et la migration des CSH (Arai et al., 2004; Frenette et al., 1998). Cependant leur importance lors de l'ASCT et l'impact de la GVHD sur leur expression demeure inconnue.

## **4.5. Thérapies de reconstitution immunitaire après l'ASCT**

### **4.5.1. Le SDF-1 $\alpha$ régénère les DC CD8 $\alpha^+$ dans les souris en GVHD**

Nous avons démontré dans le premier article que l'absence de PH des LTn CD4<sup>+</sup> était associée à une diminution de l'IL-7 et du nombre de DC. En analysant les facteurs requis pour le développement des DC, nous avons observé que la production de SDF-1 $\alpha$  était réduite dans les souris en GVHD. Ceci nous a amené à nous questionner sur l'effet potentiel du SDF-1 $\alpha$  sur la régénération des DC. L'injection intra-péritonéale de SDF-1 $\alpha$  a permis de régénérer les DC dans les souris en GVHD, principalement les DC CD8 $\alpha^+$  (Article 1, figure 5C-F). Il avait été démontré que l'axe SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 était important pour le développement des DC mais nous sommes, à ma connaissance, les premiers à démontrer que l'injection de SDF-1 $\alpha$  peut générer des DC suite à une ASCT (Kohara et al., 2007). Mais comment expliquer cet effet ?

Une première hypothèse serait que le SDF-1 $\alpha$  permet directement la différenciation des progéniteurs (CDP ou autres) en DC. Malheureusement, la mise en culture *in vitro* de cellules de MO de souris WT avec du SDF-1 $\alpha$  ne permet pas de générer des DC (Annexe figure 3A). De même, on obtient le même résultat suite au traitement de souris FL<sup>-/-</sup> avec du SDF-1 $\alpha$  (Annexe figure 3B). Ceci semble donc indiquer que le SDF-1 $\alpha$  ne peut pas directement différencier les progéniteurs en DC.

Le SDF-1 $\alpha$  est avant tout connu pour son rôle dans le maintien des CSH dans la MO (Sharma et al., 2011; Sugiyama et al., 2006). Comme les CDP expriment CXCR4, le SDF-1 $\alpha$  pourrait

être impliqué dans leur rétention au niveau de la MO et permettre ainsi leur différenciation en pré-cDC et pDC (Schmid et al., 2011). Ainsi, une absence de production de SDF-1 $\alpha$  dans les souris en GVHD pourrait engendrer une migration hâtive des CDP de la MO vers la périphérie et empêcher leur différenciation complète. En lien avec cette hypothèse, Banovic et al ont observé une absence de pDC matures et une augmentation de progéniteurs immatures dans le sang de souris en GVHD, ce qui permet effectivement de croire à un défaut de rétention des progéniteurs de DC dans la MO (Banovic et al., 2009). Nous aurions pu, à l'instar de Banovic et al, tenter d'analyser les CDP dans le sang des souris en GVHD et en voir possiblement de plus grand nombres. De même, des progéniteurs de DC ont récemment été identifiés chez l'humain (Breton et al., 2015; Lee et al., 2015). Il serait intéressant de les analyser chez des patients greffés, afin de confirmer s'il y a bel et bien migration non contrôlée des progéniteurs de DC en dehors de la MO.

Suite au traitement au SDF-1 $\alpha$ , nous avons observé une légère augmentation du nombre de CDP dans la MO des souris en GVHD (Annexe figure 3C). Il a été révélé que le SDF- $\alpha$  pouvait induire l'expression d'intégrines à la surface des CSH, comme VLA-4 et LFA-1, facilitant leur migration et leur rétention dans la MO, ce qui pourrait expliquer ce résultat (Peled et al., 2000; Plett et al., 2002). De plus, étant une chimiokine, le SDF-1 $\alpha$  pourrait attirer les CSH dans la MO. Cependant, la migration des CSH vers la MO nécessite un gradient de SDF-1 $\alpha$ , ce qui n'est probablement pas le cas dans notre modèle puisque son injection se fait de manière intra-péritonéale (Ceradini et al., 2004; Lapidot et al., 2005). Cette hypothèse demeure toutefois possible puisque Dar et al ont découvert que les cellules stromales et endothéliales de la MO avaient la capacité de capter le SDF-1 $\alpha$  circulant et de le représenter à l'intérieur de la MO, permettant ainsi la migration des CSH vers la MO (Dar et al., 2005).

Une autre hypothèse expliquant l'augmentation du nombre de DC serait que le SDF-1 $\alpha$  agit directement sur leur survie. En effet, plusieurs études ont démontré que le SDF-1 $\alpha$  pouvait augmenter la survie des CSH dans la MO et des DC en périphérie (Broxmeyer et al., 2003a, 2003b; Delgado-Martin et al., 2011; Guo et al., 2005; Hernández-López et al., 2008; Kabashima et al., 2007; Lee et al., 2002). D'ailleurs, comme Kohara et al, nous avons remarqué une augmentation du nombre de DC produites *in vitro* lorsque nous avons cultivé des cellules de



MO avec du Flt3-L et du SDF-1 $\alpha$  comparé au Flt3-L seul nous permettant de croire à un effet direct sur la survie des progéniteurs (Kohara et al., 2007).

Comparé au SDF-1 $\alpha$ , le Flt3-L régénère plus efficacement les DC dans les souris en GVHD (Article 1, figure 5A-B et F et figure supplémentaire 3). Ceci peut s'expliquer simplement par l'effet direct du Flt3-L dans l'expansion et la différenciation des progéniteurs et des cellules dendritiques comparé au SDF-1 $\alpha$  (Merad et al., 2013; Wodnar-Filipowicz, 2003). Kohara et al ont clairement démontré un rôle direct de l'axe SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 dans le développement des pDC et des cDC (Kohara et al., 2007). Cependant, l'effet du SDF-1 $\alpha$  semble être limité à la régénération des DC CD8 $\alpha^+$  dans nos souris en GVHD (Article 1, figure 5C-E). Peut-être qu'un traitement à plus long terme aurait permis de régénérer les pDC ou peut-être que ces résultats indiquent que les progéniteurs de pDC sont plus sensibles à l'absence de SDF-1 $\alpha$  et sont absents au moment du traitement. D'ailleurs, Kohara et al, concluent comme nous que le SDF-1 $\alpha$  ne joue pas un rôle direct sur la différenciation des pDC mais serait plutôt impliqué dans le maintien des progéniteurs dans la MO. Il est à ce jour difficile d'expliquer pourquoi le traitement au SDF-1 $\alpha$  n'a régénéré que les DC CD8 $\alpha^+$ . Une hypothèse simple serait que le SDF-1 $\alpha$  active une voie transcriptionnelle spécifique au développement des DC CD8 $\alpha^+$ . Toutefois, les voies de différenciation menant à la génération spécifique des pDC, des DC CD8 $\alpha^+$  et des DC CD11b $^+$  ne sont pas encore bien comprises et il n'existe aucun lien décrit dans la littérature entre l'axe SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 et les facteurs de transcriptions IRF8, Id2, Nfil3 et Batf3.

#### **4.5.2. Le SDF-1 $\alpha$ , une chimiokine immunomodulatrice ?**

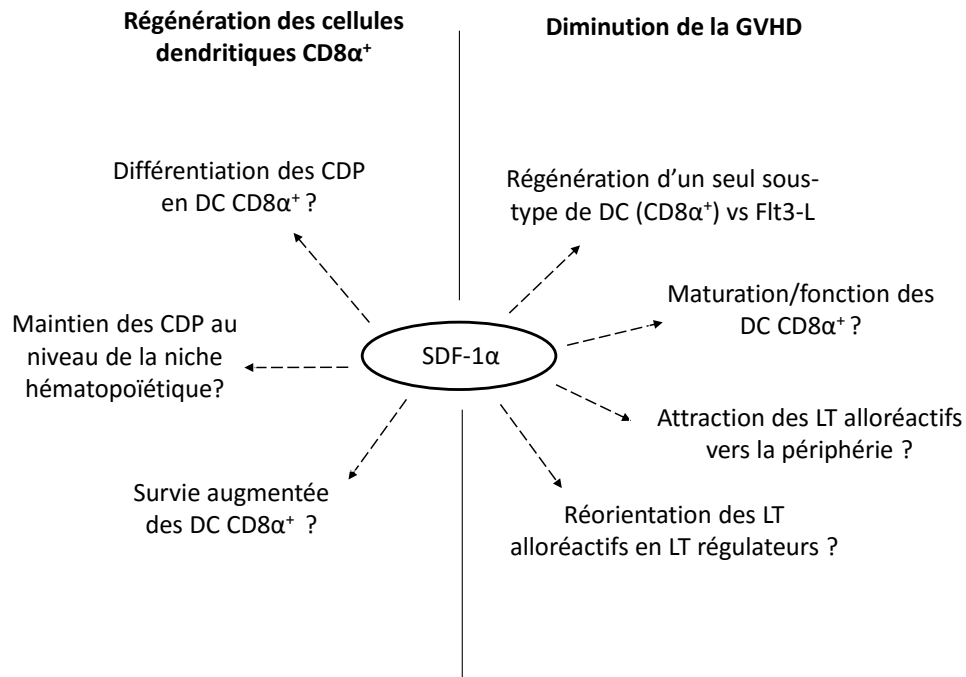
Lors de nos travaux sur la reconstitution immunitaire, nous avons observé que le SDF-1 $\alpha$  semble diminuer la gravité de la GVHD (Article 1, figure 5G-H). En effet, les souris traitées au SDF-1 $\alpha$  perdent moins de poids que les souris traitées au Flt3-L ou au PBS. De plus, une analyse histopathologique a pu confirmer une diminution de la GVHD chez les souris traitées au SDF-1 $\alpha$ . Il faudrait cependant mener une étude de survie à long terme pour confirmer un effet bénéfique du SDF-1 $\alpha$ . Nous pourrions, par exemple, traiter les souris pendant 1 mois plutôt que 2 semaines. Il serait aussi intéressant d'étudier les effets d'un traitement plus précoce sur le

développement de la GVHD (traiter au jour +7 post-greffe au lieu de +28 par exemple). Dans le même ordre d'idée, il faudrait analyser la gravité de la GVHD après l'arrêt du traitement au SDF-1 $\alpha$  afin de déterminer si son effet est temporaire ou permanent. Malgré tout, on peut émettre quelques hypothèses quant à l'action du SDF-1 $\alpha$  comme agent immuno-modulateur.

Une des premières hypothèses que nous pouvons émettre est que l'action du SDF-1 $\alpha$  passe par son effet sur la régénération des DC. Comme nous l'avons montré, le Flt3-L régénère un plus grand nombre ainsi que tous les types de DC des organes lymphoïdes comparé au SDF-1 $\alpha$  qui ne régénère que les DC CD8 $\alpha^+$ . Ceci implique, dans le cas du Flt3-L, une plus grande quantité de cellules présentatrices d'antigènes produites, et conséquemment une activation plus importante des LT alloréactifs. Toutefois, malgré une augmentation du nombre de DC, les souris traitées au SDF-1 $\alpha$  ne perdent pas autant de poids que les souris traitées au PBS ce qui porte à croire que la quantité de DC régénérée n'est pas associée à la gravité de la GVHD, à moins que les DC CD8 $\alpha^+$  n'exercent un effet immunosuppresseur dans ce contexte. Plusieurs études ont mis en évidence un effet protecteur des DC CD8 $\alpha^+$  de l'hôte au moment de l'ASCT, entre autres par l'utilisation de souris receveuses Batf3 $^{-/-}$  (Teshima et al., 2002b; Toubai et al., 2010; Weber et al., 2014). Cet effet nécessiterait un contact entre les DC et les LT et impliquerait la production d'IL-10, connue pour son rôle anti-inflammatoire (Grütz, 2005). Il faut cependant garder en mémoire que l'effet observé dans notre modèle proviendrait des DC CD8 $\alpha^+$  du donneur et que l'action des DC dépend en grande partie de l'environnement cytokinique, les DC étant plus tolérogènes dans un contexte non-inflammatoire, et plus stimulatrices dans un contexte pro-inflammatoire comme lors de la GVHD (Probst et al., 2014; Švajger and Rožman, 2014). Il est possible que le SDF-1 $\alpha$  affecte la maturation ou la fonction des DC CD8 $\alpha^+$  les rendant moins immuno-stimulatrices. Ainsi, il serait pertinent dans notre modèle d'analyser l'expression des molécules du CMH et de costimulation (comme CD80 et CD86) ou d'inhibition (comme ICOS, PD-L1 ou Fas) entre les DC CD8 $\alpha^+$  générées suite au traitement au SDF-1 $\alpha$  comparé au Flt3-L. On pourrait également mesurer la production d'IDO, de TGF- $\beta$ , d'IL-10 et d'IL-12. Finalement, il serait intéressant de greffer des souris B6D2F $_1$  avec de la MO de souris Batf3 $^{-/-}$  (qui ne peuvent pas produire de DC CD8 $\alpha^+$ ). Dans ce contexte, le traitement au SDF-1 $\alpha$  ne pourrait pas générer de DC CD8 $\alpha^+$  et, si notre hypothèse est bonne, la gravité de la GVHD ne serait pas réduite.

Une deuxième hypothèse que nous pouvons émettre est que le SDF-1 $\alpha$  attire les LT alloréactifs en dehors des organes cibles, diminuant les dommages causés par ceux-ci. En effet, le SDF-1 $\alpha$  est avant tout une chimiokine influençant la migration des leucocytes (Nagasawa, 2014). Il est donc possible que suite à notre injection intra-péritonéale, le SDF-1 $\alpha$  attire les LT alloréactifs en dehors des tissus cibles et diminue ainsi la gravité de la GVHD. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait mesurer la proportion de LT alloréactifs trouvés dans différents organes (rate, ganglions lymphatiques, MO, intestin, etc) et dans le sang de souris en GVHD traitées ou non au SDF-1 $\alpha$ .

Une dernière hypothèse que nous pouvons émettre est que le SDF-1 $\alpha$  affecte directement l'activation des LT alloréactifs. En effet, cette hypothèse se base principalement sur les résultats obtenus par Meiron et al (Meiron et al., 2008). Dans leur étude, les auteurs démontrent que l'injection de SDF-1 $\alpha$  par voie intraveineuse réprime le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale en redirigeant la polarisation des LT Th1 autoréactifs en LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> produisant de l'IL-10. En lien avec ces résultats, Lin et al ont démontré que le transfert de Tregs au moment d'une ASCT diminue la GVHD en interrompant l'interaction entre les LT alloréactifs et les DC de l'hôte (Lin et al., 2014). Cette action nécessite la production d'IL-10 par les Tregs qui entraîne une diminution de l'expression de CD86, une molécule de costimulation, et CD54, une molécule d'adhésion, à la surface des DC. Transposés à notre modèle, ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que le traitement au SDF-1 $\alpha$  réoriente les LT alloréactifs vers un phénotype régulateur, producteur d'IL-10. L'IL-10 pourrait ensuite diminuer l'expression de molécules de co-stimulation et d'adhésion et ainsi diminuer la GVHD. Une expérience importante dans notre modèle serait donc d'analyser le phénotype des LT du donneur ainsi que leur production d'IL-10 après traitement des souris au SDF-1 $\alpha$ . Les résultats de Lin et al confirment également la pertinence d'analyser l'expression des molécules de co-stimulation à la surface des DC, comme proposé dans la première hypothèse, ainsi que les molécules d'adhésion entre DC et LT.



**Figure 4.2: Résumé des actions potentielles du SDF-1 $\alpha$**

#### 4.5.3. Différence de reconstitution entre lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>

Seule la reconstitution des DC combinée à l'IL-7 permet de repartir la PH des LTn CD4<sup>+</sup> dans un contexte de GVHD (Article 1, figure 6B). Plus précisément, il semble que les DC CD8 $\alpha^+$  soient suffisantes pour soutenir leur expansion. Pour confirmer l'importance de ce sous-type de DC, on pourrait croiser la souris Batf3<sup>-/-</sup> (qui ne peut pas générer des DC CD8 $\alpha^+$ ) à la souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ . Dans ces souris Batf3<sup>-/-</sup>IL-7R $\alpha^{-/-}$ , la PH des LT CD4<sup>+</sup> devrait être abolie. De même, la PH des LT CD4<sup>+</sup> ne devrait pas être restaurée suite au traitement au SDF-1 $\alpha$  et à l'IL-7 dans des souris en GVHD qui ont été greffées avec de la MO de souris Batf3<sup>-/-</sup>.

À la différence des LTn CD4<sup>+</sup>, le traitement à l'IL-7 de souris en GVHD suffit pour restaurer la PH des LTn CD8<sup>+</sup> malgré l'absence des DC (Article 2, figure 1C-D). Ceci laisse à penser que,

dans ce contexte, les DC ne sont pas nécessaires à la PH des LTn CD8<sup>+</sup>. Plusieurs études ont démontré que les DC étaient requises pour permettre la survie et la prolifération des LTn CD4<sup>+</sup> (Brocker, 1997; Do and Min, 2009a; Guimond et al., 2009). En ce qui concerne les LTn CD8<sup>+</sup>, la nécessité d'une interaction avec les DC pour engendrer leur PH est encore objet de controverse. En effet, certaines études ont démontré que les DC étaient nécessaires pour induire la PH des LTn CD8<sup>+</sup> et que leur perte était associée à une diminution importante de la prolifération de ces cellules (Gruber and Brocker, 2005; Zaft et al., 2005). À l'inverse, d'autres travaux ont mis en évidence que les LTn CD8<sup>+</sup> pouvaient encore proliférer homéostatiquement dans des chimères CD11cDTR→B6 traitées à la toxine diphtérique et que des cellules stromales, non-dérivées de la moelle osseuse, pouvaient induire leur PH (Do and Min, 2009a; Schluns et al., 2000; Zaft et al., 2005). Dans notre modèle de souris chimères Rag<sup>-/-</sup>β2m<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup>, l'expression du CMH I par les DC n'est pas essentielle à la PH des LTn CD8<sup>+</sup> (Article 2, figure 3D). Cependant, nous ne pouvons pas conclure que les DC ne sont pas nécessaires à la PH des LTn CD8<sup>+</sup> puisque notre modèle n'exclut pas la possibilité que les DC fournissent aux LTn CD8<sup>+</sup> un autre signal de survie et/ou prolifération via la production de cytokines homéostatiques comme l'IL-7 ou IL-15 par exemple (Do and Min, 2009b; Guimond et al., 2009; Zecher et al., 2010). Quoiqu'il en soit, l'absence d'expression du CMH I sur les DC affecte l'amplitude de la PH puisque les OT-I transférés prolifèrent moins dans les souris chimères Rag<sup>-/-</sup>β2m<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup> que dans les souris contrôles Rag<sup>-/-</sup>→Rag<sup>-/-</sup> (Article 2, figure 3D-F). Cette diminution de la PH des LTn CD8<sup>+</sup> pourrait s'expliquer soit par un défaut quantitatif de la signalisation du TCR sur les OT-I (moins de CMH I) ou un défaut qualitatif (absence du CMH I sur les DC).

Dans un autre ordre d'idée, ces résultats nous amènent à nous questionner sur l'importance des signaux fournis par le TCR et l'IL-7 dans la PH des LTn. Seddon et Zamoyska ont démontré que l'absence commune des signaux du TCR et de l'IL7R entraînait une perte plus rapide du nombre de LTn qu'en l'absence d'un seul de ces signaux, indiquant ainsi une coopération de ces voies de signalisation dans l'homéostasie des LTn (Seddon and Zamoyska, 2002). D'ailleurs, il est connu qu'une forte signalisation de l'IL-2 ou de l'IL-15 ne peut surmonter l'absence d'interaction entre le TCR et le psCMH. (Cho et al., 2007). Aussi, des OT-I transférés dans une souris β2m<sup>-/-</sup> ne survivent pas même si la souris est traitée à l'IL-7 pendant 7 jours (observation de Gauthier SD). Cependant, étant donné que la voie de l'IL-7Rα est connue

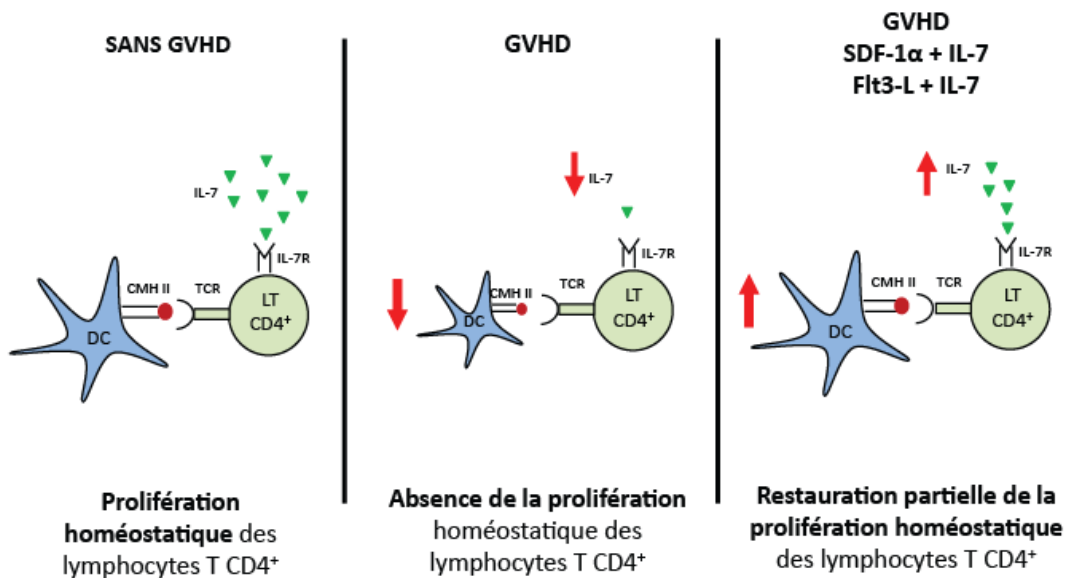
pour accroître la survie et le métabolisme des LTn, on peut se demander quel rôle joue le TCR : fournit-il un signal qualitatif distinct ou permet-il simplement de renforcer la même voie de signalisation ? Il est possible que la faible signalisation du TCR induite par le psCMH n'ait comme fonction que d'augmenter la sensibilité aux cytokines homéostatiques. En effet, il a été démontré que le transfert de LTn CD8<sup>+</sup> dans des souris CMH I<sup>-/-</sup> entraînait une perte rapide de la sensibilité à l'IL-2 et l'IL-15 (Cho et al., 2010). Dans le même ordre d'idée, notre laboratoire a découvert que l'augmentation de l'interaction TCR-psCMH accentuait la réponse à l'IL-7 des LTn en périphérie (Hennion-Tscheltzoff et al., 2013).

Nous confirmons également dans notre étude que les LTn CD8<sup>+</sup> sont plus sensibles à l'IL-7 que les LTn CD4<sup>+</sup> (Article 2, figure 2). Il est connu que cette différence n'est pas due à l'expression de l'IL-7R puisque ces deux types de LT expriment des quantités similaires (Cho et al., 2010; Guimond et al., 2009). Cho et al ont découvert que la sensibilité des LTn CD8<sup>+</sup> à l'IL-7 corrèle avec la présence accrue de radeaux lipidiques à la surface cellulaire. Ces derniers pourraient jouer un rôle dans le rassemblement des récepteurs des cytokines de la famille  $\gamma_c$ , comme l'IL-7R, et ainsi induire une meilleure signalisation. De plus, la densité des radeaux lipidiques à la surface cellulaire dépendrait de l'interaction entre le TCR et le psCMH. À cet égard, Cho et al démontrent que les LTn CD8<sup>+</sup> expriment davantage de radeaux lipidiques que les LTn CD4<sup>+</sup>. Comme le CMH I est exprimé de manière ubiquitaire, ceci expliquerait la sensibilité accrue des LT CD8<sup>+</sup> à l'IL-7 comparativement aux LTn CD4<sup>+</sup> qui sont dépendants de l'expression du CMH II, limitée aux APC. En plus de la quantité de signal par le TCR, il se pourrait que la qualité de ce signal varie entre les LTn CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, affectant la sensibilité à l'IL-7. Il a par exemple été découvert que plusieurs régulateurs négatifs de la signalisation du TCR peuvent compromettre l'amplitude de la PH (Krieg et al., 2007; Posevitz et al., 2008; Workman and Vignali, 2005). Par exemple, la PH de LT ayant un TCR faible affinité pour le psCMH est augmentée lorsque l'on retire les molécules SIT, LAG-3 ou BTLA-4. Il reste cependant à vérifier si leur expression est plus forte chez les LTn CD4<sup>+</sup> que LTn CD8<sup>+</sup>, ce qui semble être le cas pour BTLA-4 (Han et al., 2004).

En résumé, la sensibilité accrue à l'IL-7, ainsi que le rôle non essentiel des DC dans la PH des LTn CD8<sup>+</sup>, permettent à ces cellules de mieux répondre à la thérapie à l'IL-7 lors de la GVHD

et pourrait en partie expliquer pourquoi leur reconstitution post-greffe est plus rapide que celle des LT CD4<sup>+</sup> (tableau II).

### Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs



### Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs

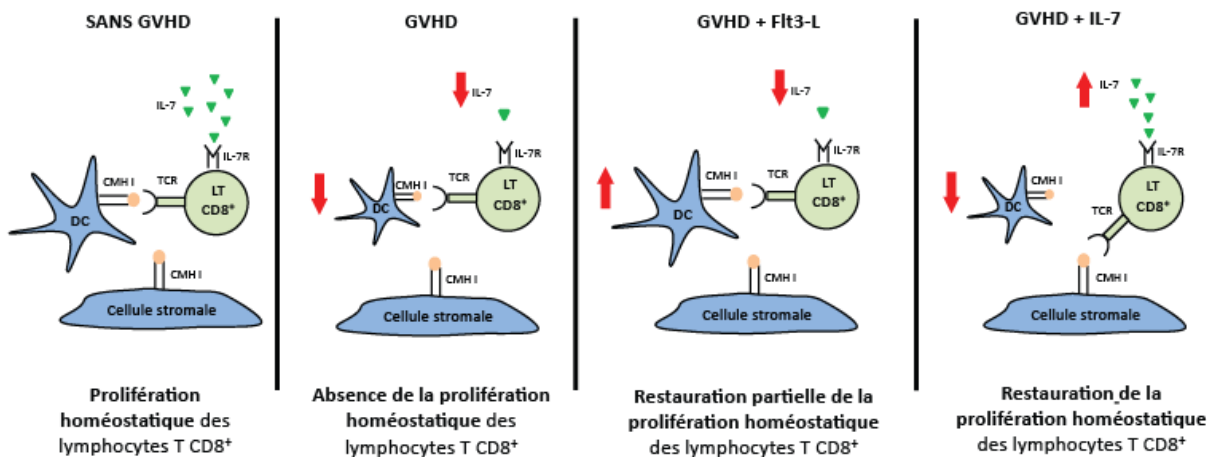


Figure 4.3 : Résumé des traitements permettant la restauration de la prolifération homéostatique des LTn CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>

## 4.6. Perspectives

### 4.6.1. L'importance de la reconstitution des lymphocytes T naïfs

Comme nous l'avons vu précédemment, la lymphopénie ainsi qu'une faible diversité du répertoire sont associées à des risques accrus de rechutes ou d'infections suite à l'ASCT (Le Blanc et al., 2009; Mackall et al., 1996; Parody et al., 2015; Savani et al., 2006). Ainsi, la reconstitution post-greffe d'un répertoire diversifié de LT est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire (Gorski et al., 1994; Talvensaari et al., 2002). La solution idéale dans ce contexte serait de restaurer la thymopoïèse, malheureusement aucune thérapie ne le permet en ce moment. La restauration de la PH des LT demeure donc la meilleure option afin d'augmenter le nombre et la diversité des LT. De façon très intéressante, Gorski et al ont démontré qu'une population de LT provenant de souris en GVHD pouvait rétablir une diversité du répertoire lorsque transférée dans un hôte sans GVHD. Ceci indique, non pas l'absence, mais la sous-représentation de clones de LT non-alloréactifs qui persistent dans la souris en GVHD (du moins à 19 jours post-greffe) et qui ont la capacité de proliférer pour normaliser le répertoire (Gorski et al., 2007). Dans ce contexte, l'intérêt d'employer une thérapie comme la nôtre devient pertinent puisque le traitement au SDF-1 $\alpha$  et à l'IL-7 permet justement d'améliorer la PH de ces LT non-alloréactifs. Ainsi, il serait possible de rétablir une protection anti-pathogène et possiblement anti-tumorale.

D'un point de vue général, les LT CD8<sup>+</sup> sont considérés comme les cellules nécessaires à l'élimination des pathogènes ou corps malins tandis que le rôle des LT CD4<sup>+</sup> est d'orchestrer la réponse immunitaire. De plus, comme la majorité des tissus sains du corps, les cellules tumorales expriment peu, ou pas, le CMH II. C'est pourquoi la majorité des travaux en immunothérapie du cancer sont effectués avec des LT CD8<sup>+</sup>. Cependant, l'instabilité génétique des cellules tumorales peut entraîner l'arrêt de l'expression du CMH I à leur surface, rendant les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques inefficaces. Finalement, les LT CD8<sup>+</sup> n'ont pas la capacité d'élargir la réponse anti-tumorale comme les LT CD4<sup>+</sup> et meurent généralement par épuisement sans générer de LT CD8<sup>+</sup> mémoires contre les cellules tumorales (Ahmadzadeh et al., 2009).



Plusieurs études ont révélé la capacité des LT CD4<sup>+</sup> à engendrer une réponse anti-tumorale (Muranski and Restifo, 2009; Quezada et al., 2010; Xie et al., 2010). Les LT CD4<sup>+</sup> produisent de l'IFN $\gamma$  qui module l'expression du CMH à la surface des cellules tumorales et peuvent acquérir des fonctions cytotoxiques permettant d'éliminer ces cellules (Zanetti, 2015). D'ailleurs, Perez-Diez et al, bien qu'utilisant un modèle de LT TCR-transgénique, démontrent que les LT CD4<sup>+</sup> ont une meilleure capacité à éliminer les cellules tumorales que les LT CD8<sup>+</sup>, et cela même quand les cellules tumorales n'expriment pas le CMH II (Perez-Diez et al., 2007). Ceci s'expliquerait par le fait que, contrairement aux LT CD8<sup>+</sup>, les LT CD4<sup>+</sup> peuvent également reconnaître les antigènes tumoraux grâce au CMH II exprimé par les APC. Les LT CD4<sup>+</sup> une fois activés permettraient aux APC d'activer les LT CD8<sup>+</sup> et recruteraient des macrophages et des cellules NK, ce qui amplifierait la réponse anti-tumorale. D'ailleurs, dans un modèle de LT CD8<sup>+</sup> TCR transgénique spécifiques à un antigène tumoral, l'ajout de LTn CD4<sup>+</sup> non-spécifiques augmente la régression de la tumeur, démontrant ainsi leur potentiel dans le déclenchement d'une réponse anti-tumorale de plus grande amplitude (Antony et al., 2005). Récemment, Quezada et al ont démontré que l'instauration d'une lymphopénie avant le transfert d'une faible quantité de LTn CD4<sup>+</sup> réactifs contre la tumeur accroît leur nombre, leur activation et leur efficacité à éliminer celle-ci (Quezada et al., 2010). De même, Dudley et al ont observés chez l'humain que le transfert de LT CD8<sup>+</sup> anti-tumoraux développés in vitro entraîne une réponse anti-tumorale jusqu'à chez 72% des patients qui reçoivent des traitements parallèles d'irradiation pour induire une lymphopénie (Dudley et al., 2008). Les raisons pour lesquelles la lymphopénie augmenterait l'efficacité anti-tumorale des lymphocytes sont multiples. Premièrement, celle-ci permettrait une prolifération accrue (prolifération homéostatique) des LTn, principalement des LTn CD8<sup>+</sup>, ce qui augmenterait leur nombre et donc la proportion de LT anti-tumoraux. Deuxièmement, les niveaux élevés d'IL-7, ainsi que la biodisponibilité d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL-2, pourraient également permettre un meilleur survie des LTn et des LT anti-tumoraux activés, et donc augmenter la réponse anti-tumorale. Finalement, les traitements permettant d'induire la lymphopénie, comme l'irradiation, pourraient eux même jouer un rôle en causant des dommages aux cellules tumorales et permettre ainsi la relâche d'antigènes tumoraux, ou également en causant de l'inflammation.

En conclusion, ces observations mettent en évidence le rôle de la lymphopénie dans l'amplification d'une réaction anti-tumorale et attestent encore de l'importance du développement d'une thérapie permettant la reconstitution des LTn après une ASCT.

#### **4.6.2. L'impact de l'absence des cellules dendritiques**

Une des étapes importantes dans le déclenchement de la GVL est l'activation des LT du donneur contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité présentés par la tumeur ou communs à l'hôte et la tumeur. Pour cela, les LT nécessitent la présentation des antigènes par les DC. Bien qu'il ait été démontré par Matte et al que les DC du donneur ne sont pas nécessaires au développement de la GVL, Reddy et ses collègues ont observé que ces DC peuvent contribuer à la réponse anti-tumorale (Matte et al., 2004; Reddy et al., 2005). Cependant, les auteurs précisent que les DC du donneur n'induisent une GVL efficace que lorsque la charge tumorale est réduite. Ainsi, comme les DC du receveur sont éliminées rapidement après l'ASCT, il devient important de régénérer les DC du donneur afin de favoriser une GVL post-greffe.

La diminution du nombre de DC dans la rate des souris en GVHD nous amène à nous interroger sur le devenir des DC situées au niveau du thymus. Les DC thymiques jouent un rôle important dans la sélection négative des LT, et leur absence pourrait entraîner la production de LT auto-réactifs (Wu and Shortman, 2005). Comparé à la GVHD aiguë, l'étiologie de la GVHD chronique est moins bien connue (Socié and Ritz, 2014). La GVHD chronique ressemble d'avantage à une maladie auto-immune chronique qu'à une réaction cytotoxique comme la GVHD aiguë. Edelman et al ont démontré que des LT alloréactifs transférés dans une souris greffée peuvent s'activer et migrer dans le thymus où ils induisent un arrêt de la sélection négative et entraînent la génération des LT autoréactifs endogènes (Edelman 2001). De même Zhang et al ont observé dans un contexte d'ASCT que des LT CD4<sup>+</sup> générés à partir de la moelle osseuse du donneur peuvent induire une GVHD chronique (Zhang et al., 2007). Ces LT CD4<sup>+</sup> se développent dans un thymus endommagé par la GVHD aiguë causée par les LT CD8<sup>+</sup>. Toutefois, bien que ces résultats permettent de croire que les LT qui ont migré dans le thymus éliminent les DC thymiques, ils n'écartent pas la possibilité que les cellules épithéliales

thymiques de la médulla (mTECs) soient également affectées. Il a d'ailleurs été récemment démontré que ces cellules pouvaient être directement éliminées par les LT alloréactifs lors de la GVHD (Dertschnig et al., 2015; Wu et al., 2013). Ainsi, l'impact de la perte des DC dans le thymus sur le développement de la GVHD chronique demeure imprécis.

#### **4.6.3. Les obstacles à la thérapie de reconstitution immunitaire**

Comme avec tout nouveau traitement, on doit s'assurer que les bienfaits apportés surpassent les effets délétères. Dans notre modèle, nous avons observé que le Flt3-L aggravait la GVHD, confirmant les résultats de Blazar et al (Blazar et al., 2001). Cet effet est logique puisque le Flt3-L augmente le nombre de DC, et de ce fait la présentation antigénique, ce qui amplifie l'alloréactivité. L'effet de l'IL-7 sur la GVHD reste encore controversé mais dépendrait beaucoup du moment choisi pour débiter le traitement (Alpdogan et al., 2001; Sinha et al., 2002). En effet, un traitement administré directement après la greffe pourrait accroître le nombre de LTn alloréactifs tandis qu'un traitement administré plus tardivement n'aurait plus d'effets sur ces cellules puisqu'elles n'exprimeraient plus l'IL-7R, étant activées. Contrairement à ces thérapies, nous avons démontré que le SDF-1 $\alpha$  semble diminuer la GVHD. Quelle qu'en soit la raison, il est encourageant de constater qu'un traitement puisse reconstituer la population de LT sans aggraver la GVHD. Cependant, en admettant que le SDF-1 $\alpha$  induit une immunosuppression globale, nous devons, à juste titre, nous questionner sur l'effet anti-tumoral des LT dans ce contexte.

#### **4.6.4. La prolifération homéostatique, une prolifération unique ?**

En lien avec la reconstitution de la PH des LTn suite à une ASCT, nous avons entrepris un projet exploratoire visant à comprendre les mécanismes de la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. L'objectif de cette étude était de caractériser le profil d'expression génique spécifique à la PH, et, si possible, d'identifier une cible moléculaire permettant d'induire la PH des LT CD4<sup>+</sup> dans un contexte de lymphopénie. Pour se faire, nous avons utilisé à nouveau notre modèle de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> anti-HY marqués au CTV dans des souris receveuses IL-7R $\alpha$ <sup>-/-</sup>, permissives

à la PH (Annexe figure 4A). Pour déceler les gènes différentiellement exprimés (GDE) dans les LT CD4<sup>+</sup> en PH, nous avons comparé leur transcriptome à celui de LT CD4<sup>+</sup> transférés dans des souris Rag<sup>-/-</sup> femelles (pas de prolifération, contexte lymphopénique), des souris Rag<sup>-/-</sup> mâles (prolifération par activation) et des souris B6 femelles (pas de prolifération, pas de contexte lymphopénique) (Annexe, figure 4A-D). Sept jours après transfert, les LT ont été triés grâce à leur profil de CTV et leur transcriptome séquencé (Annexe, figure 5A). À partir de ces résultats, nous avons établi une liste de GDE spécifiques à la PH en comparant les gènes surexprimés ou sous-exprimés des LT en PH à ceux des LT qui ne prolifèrent pas (receveur Rag<sup>-/-</sup> femelle) ou qui prolifèrent suite à leur activation (receveur Rag<sup>-/-</sup> mâle) (Annexe, figure 5B-C). Ceci nous a permis entre autres d'isoler 105 gènes spécifiquement surexprimés dans les LT en PH (Annexe figure 5D). En analysant cette liste dans la banque de données DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), nous avons remarqué que ces gènes étaient associés à la voie de signalisation Jak-STAT, à l'interaction cytokine-récepteur de cytokine et au cycle cellulaire, toutes des voies associées à la PH (Annexe tableau I). De manière intéressante, l'ARNm de l'IL-4R était surexprimé d'au moins 1.5X dans les LT en PH comparé aux autres conditions, suggérant le rôle possible de cette cytokine dans la régulation de la PH des LTn CD4<sup>+</sup> (Annexe, figure 6A). En lien avec ces résultats, nous avons découvert en utilisant une fonction du logiciel Ingenuity Pathway Analysis que l'IL-4 pouvait être un régulateur commun aux 105 gènes spécifiquement exprimés dans les LT en PH (Annexe tableau II).

L'IL-4 faisant partie de la famille des cytokines  $\gamma$ c comme l'IL-7, nous nous sommes questionné sur son implication dans la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. Dans la littérature, l'IL-4 est connue pour accroître la survie des LT *in vitro* (Boursalian and Bottomly, 1999; Vella et al., 1997). Par contre, bien qu'elle puisse entraîner l'activation de STAT5, aucune étude ne s'est penchée sur son implication dans la PH des LTn CD4<sup>+</sup> (Lischke et al., 1998). Toutefois l'IL-4 peut accroître la survie et la prolifération des Tregs (Pillai et al., 2009; Yates et al., 2007). Afin de confirmer ces résultats de bioinformatique, nous avons décidé d'évaluer l'expression de l'IL-4R à la surface de nos LT anti-HY transférés dans les différents receveurs. Comme prévu par nos analyses, l'IL-4R était surexprimé à la surface des LT CD4<sup>+</sup> en PH comparé aux autres groupes (Annexe figure 6B). Pour s'assurer de l'implication de la signalisation de l'IL-4 dans la PH des LT CD4<sup>+</sup> nous avons transféré des LT CD4<sup>+</sup> IL-4R $\alpha$ <sup>-/-</sup> avec des LT CD4<sup>+</sup> WT dans nos souris

IL-7R $\alpha^{-/-}$ , l'hypothèse étant que les LT IL-4R $\alpha^{-/-}$  ne puissent plus entreprendre de PH puisqu'ils ne peuvent plus répondre à l'IL-4 (Annexe figure 6C). Malheureusement, notre expérience préliminaire n'a pas démontré de différence de prolifération entre les LT IL-4R $\alpha^{-/-}$  et les LT contrôles (Annexe figure 6D). Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à ce résultat. Bien que l'IL-4R $\alpha$  soit surexprimé spécifiquement à la surface des LT CD4 $^{+}$  en PH, il se peut que cette surexpression soit une cause de la PH et pas nécessaire à celle-ci. De plus, il est connu que la signalisation du TCR et de l'IL-7 est nécessaire à la PH des LT CD4 $^{+}$ . Il aurait donc été surprenant que seule l'inhibition de la signalisation de l'IL-4 affecte la PH.

Il se peut également que les signaux nécessaires au déclenchement de la PH se produisent dans les heures ou les jours après transfert et que nous les ayons manqués en isolant les LT 7 jours après transfert. Une analyse similaire a déjà été entreprise pour les LTn CD8 $^{+}$  (Goldrath et al., 2004). Dans leur étude, Goldrath et al n'ont pas trouvé de profil d'expression génique spécifique à la PH des LT CD8 $^{+}$ . Cependant les auteurs arrivent à cette conclusion en démontrant une similarité du profil génique des LT CD8 $^{+}$  en PH avec les LT CD8 activés ou LT CD8 mémoires pour des listes de gènes bien spécifiques à ces conditions. Dans notre étude, nous avons plutôt décidé de nous concentrer sur les gènes spécifiquement régulés dans les LTn CD4 $^{+}$ . Il serait quand même intéressant de comparer nos LT CD4 $^{+}$  anti-HY en PH à ceux en activation ou mémoires afin de voir si les résultats sont similaires à ceux observés chez les LT CD8 $^{+}$ . Finalement, l'IL-4 n'est pas le seul régulateur en amont qui a été proposé suite à l'analyse bio-informatique. Une étude plus poussée des autres régulateurs pourrait éventuellement mener à une meilleure compréhension de la régulation de la PH des LTn CD4 $^{+}$ .

## Conclusion

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques a, en quelques décennies, évolué d'une technique expérimentale au traitement standard contre différents types de cancers, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Malgré de nombreux progrès dans ce domaine, que ce soit au niveau du régime de préparation, de la détermination des antigènes majeurs d'histocompatibilité, de la prophylaxie, et bien d'autres, le succès de cette technique est restreint par la GVHD, les rechutes et les infections opportunistes. De façon significative, la réaction anti-tumorale qui permet d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles, ainsi que la réaction immunitaire qui permet de défendre l'organisme des infections, dépendent de la reconstitution des LT post-greffe. Malheureusement, la maladie du greffon contre l'hôte entrave leur reconstitution et il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour régénérer ces cellules.

Nous avons démontré dans nos travaux que la GVHD entrave la reconstitution des LTn dû à une régénération défectueuse des DC et à une faible production d'IL-7. Ces résultats indiquent que la GVHD entraîne des dommages à la niche hématopoïétique mais également à la niche périphérique régulant la PH des LTn. Ces dommages perdurent également à long terme puisque l'élimination des LT alloréactifs ne permet pas de régénérer les DC, et ce même plusieurs mois après traitement.

Nous avons aussi découvert que le SDF-1 $\alpha$  joue un rôle important dans la reconstitution des DC durant la GVHD. En effet, bien que son mécanisme d'action ne soit pas compris, le traitement au SDF-1 $\alpha$  permet de régénérer les DC et, en combinaison avec de l'IL-7, permet d'améliorer la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. À la différence des LTn CD4<sup>+</sup>, l'IL-7 seule est capable de restaurer la PH des LTn CD8<sup>+</sup>. Ceci démontre l'existence de différences fondamentales entre ces deux types de cellules quant au contrôle de leur PH durant la GVHD. Le SDF-1 $\alpha$  semble également diminuer la gravité de la GVHD mais d'autres études seront nécessaires pour confirmer et comprendre cet effet. D'un point de vue plus fondamental, nos travaux impliquent les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> comme régulateurs principaux de la PH des LTn CD4<sup>+</sup>. Finalement, ces résultats permettent de croire également que la GVHD entraîne des dommages chroniques à la niche hématopoïétique, un aspect souvent mis de côté par les chercheurs mais qui demeure un facteur clé dans la

reconstitution du système immunitaire après une ASCT. En conclusion, l'ensemble de ces observations ouvre la voie à des études translationnelles sur le potentiel thérapeutique du SDF-1 $\alpha$  dans la reconstitution immunitaire après une ASCT, mais également sur le rôle qu'il semble jouer dans la maîtrise de la gravité de la GVHD.

## Bibliographie

Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S.A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* *114*, 1537–1544.

Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis e Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells. *Blood* *101*, 305–310.

Alpdogan, O., Schmaltz, C., Muriglan, S.J., Kappel, B.J., Perales, M.-A., Rotolo, J.A., Halm, J.A., Rich, B.E., and van den Brink, M.R.M. (2001). Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* *98*, 2256–2265.

Alpdogan, Ö., Muriglan, S.J., Eng, J.M., Willis, L.M., Greenberg, A.S., Kappel, B.J., and van den Brink, M.R.M. (2003). IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Invest.* *112*, 1095–1107.

Alpdogan, O., Eng, J.M., Muriglan, S.J., Willis, L.M., Hubbard, V.M., Tjoe, K.H., Terwey, T.H., Kochman, A., and van den Brink, M.R.M. (2005). Interleukin-15 enhances immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *105*, 865–873.

Amos, C.L., Woetmann, A., Nielsen, M., Geisler, C., Odum, N., Brown, B.L., and Dobson, P.R. (1998). The role of caspase 3 and BclxL in the action of interleukin 7 (IL-7): a survival factor in activated human T cells. *Cytokine* *10*, 662–668.

Anderson, B.E., McNiff, J., Yan, J., Doyle, H., Mamula, M., Shlomchik, M.J., and Shlomchik, W.D. (2003). Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *112*, 101–108.

Anderson, B.E., Taylor, P.A., McNiff, J.M., Jain, D., Demetris, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Ager, A., Blazar, B.R., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2008). Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. *Blood* *111*, 5242–5251.

Anthony, B.A., and Link, D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* *35*, 32–37.

Antin, J.H. (2001). Acute graft-versus-host disease: inflammation run amok? *J. Clin. Invest.* *107*, 1497–1498.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.-C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., et al. (2005). CD8+ T cell



immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 2591–2601.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. *Immunity* *19*, 257–267.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell* *118*, 149–161.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C.-L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* *362*, 761–763.

Arpinati, M., Chirumbolo, G., Urbini, B., Bonifazi, F., Bandini, G., Sauntharajah, Y., Zagnoli, A., Stanzani, M., Falcioni, S., Perrone, G., et al. (2004). Acute graft-versus-host disease and steroid treatment impair CD11c<sup>+</sup> and CD123<sup>+</sup> dendritic cell reconstitution after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *10*, 106–115.

Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y.Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., et al. (2000). Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* *403*, 211–216.

Bacigalupo, A. (2005). Antilymphocyte/thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant.* *35*, 225–231.

Baker, M.B., Riley, R.L., Podack, E.R., and Levy, R.B. (1997). Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 1366–1371.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245–252.

Banovic, T., Markey, K.A., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Don, A.L., Degli-Esposti, M.A., Engwerda, C.R., MacDonald, K.P.A., and Hill, G.R. (2009). Graft-versus-host disease prevents the maturation of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 912–920.

Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2001). Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood* *98*, 1524–1531.

Barata, J.T., Silva, A., Brandao, J.G., Nadler, L.M., Cardoso, A.A., and Boussiotis, V.A. (2004). Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* *200*, 659–669.

- Barnes, D.W.H., and Loutit, J.F. (1953). Protective effects of implants of splenic tissue. *Proc. R. Soc. Med.* *46*, 251–252.
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br. Med. J.* *2*, 626–627.
- Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1541–1548.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *10*, 488–495.
- van Bekkum, D.W., de Vries, M.J., and van der Waay, D. (1967). Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J. Natl. Cancer Inst.* *38*, 223–231.
- Bensinger, W.I., Clift, R., Martin, P., Appelbaum, F.R., Demirer, T., Gooley, T., Lilleby, K., Rowley, S., Sanders, J., Storb, R., et al. (1996). Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood* *88*, 2794–2800.
- Berger, C., Turtle, C.J., Jensen, M.C., and Riddell, S.R. (2009). Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 224–232.
- Beutler, E., Blume, K.G., Bross, K.J., Chillar, R.K., Ellington, O.B., Fahey, J.L., Farbstein, M.J., Schmidt, G.M., Spruce, W.E., and Turner, M.A. (1979). Bone marrow transplantation as the treatment of choice for “good risk” adult patients with acute leukemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* *92*, 189–195.
- Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* *62*, 21–78.
- Billingham, R.E., and Brent, L. (1957). Acquired tolerance in newborn mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *69*, 678–680.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* *371*, 1579–1586.
- Le Blanc, K., Barrett, A.J., Schaffer, M., Hägglund, H., Ljungman, P., Ringdén, O., and Remberger, M. (2009). Lymphocyte Recovery Is a Major Determinant of Outcome after Matched Unrelated Myeloablative Transplantation for Myelogenous Malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *15*, 1108–1115.

Blanco, B., Pérez-Simón, J.A., Sánchez-Abarca, L.I., Carvajal-Vergara, X., Mateos, J., Vidriales, B., López-Holgado, N., Maiso, P., Alberca, M., Villarón, E., et al. (2006). Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 107, 3575–3583.

Blaser, B.W., Roychowdhury, S., Kim, D.J., Schwind, N.R., Bhatt, D., Yuan, W., Kusewitt, D.F., Ferketich, A.K., Caligiuri, M.A., and Guimond, M. (2005). Donor-derived IL-15 is critical for acute allogeneic graft-versus-host disease. *Blood* 105, 894–901.

Blazar, B.R., Taylor, P.A., Linsley, P.S., and Vallera, D.A. (1994). In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood* 83, 3815–3825.

Blazar, B.R., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Buhlman, J., Xu, J., Flavell, R.A., Korngold, R., Noelle, R., and Vallera, D.A. (1997). Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 29–39.

Blazar, B.R., McKenna, H.J., Panoskaltis-Mortari, A., and Taylor, P.A. (2001). Flt3 ligand (FL) treatment of murine donors does not modify graft-versus-host disease (GVHD) but FL treatment of recipients post-bone marrow transplantation accelerates GVHD lethality. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7, 197–207.

Blazar, B.R., Sharpe, A.H., Chen, A.I., Panoskaltis-Mortari, A., Lees, C., Akiba, H., Yagita, H., Killeen, N., and Taylor, P.A. (2003). Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood* 101, 3741–3748.

Bloom, M.L., Wolk, A.G., Simon-Stoos, K.L., Bard, J.S., Chen, J., and Young, N.S. (2004). A mouse model of lymphocyte infusion-induced bone marrow failure. *Exp. Hematol.* 32, 1163–1172.

De Bock, M., Fillet, M., Hannon, M., Seidel, L., Merville, M.-P., Gothot, A., Beguin, Y., and Baron, F. (2013). Kinetics of IL-7 and IL-15 Levels after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning. *PLoS ONE* 8, e55876.

Bolotin, E., Annett, G, Parkman R, and Weinberg K (1999). Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Publ. Online* 08 April 1999 Doi101038sjbmt1701655 23.

Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 1092–1100.

von Bonin, M., and Bornhäuser, M. (2014). Concise Review: The Bone Marrow Niche as a Target of Graft Versus Host Disease. *STEM CELLS* 32, 1420–1428.

- Bosch, M., Khan, F.M., and Storek, J. (2012). Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Hematol.* *19*, 324–335.
- Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* *125*, 2621–2629.
- Boursalian, T.E., and Bottomly, K. (1999). Survival of Naive CD4 T Cells: Roles of Restricting Versus Selecting MHC Class II and Cytokine Milieu. *J. Immunol.* *162*, 3795–3801.
- Boyman, O., Ramsey, C., Kim, D.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2008). IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 7265–7275.
- Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Pühr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., et al. (2015). Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* [jem.20141441](https://doi.org/10.1084/jem.20141441).
- van den Brink, M.R.M., Alpdogan, Ö., and Boyd, R.L. (2004). Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 856–867.
- Brochu, S., Rioux-Massé, B., Roy, J., Roy, D.C., and Perreault, C. (1999). Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* *94*, 390–400.
- Brocker, T. (1997). Survival of Mature CD4 T Lymphocytes Is Dependent on Major Histocompatibility Complex Class II–expressing Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1223–1232.
- Broers, A.E.C., Sluijs, S.J.P., Spits, H., van der Holt, B., Löwenberg, B., Braakman, E., and Cornelissen, J.J. (2003). Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell–depleted bone marrow transplantation in T-cell–deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood* *102*, 1534–1540.
- Broxmeyer, H.E., Kohli, L., Kim, C.H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Shaheen, M., Li, X., and Clapp, D.W. (2003a). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and Gαi proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 630–638.
- Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Kohli, L., Hangoc, G., Lee, Y., Mantel, C., Clapp, D.W., and Kim, C.H. (2003b). Transgenic Expression of Stromal Cell-Derived Factor-1/CXC Chemokine Ligand 12 Enhances Myeloid Progenitor Cell Survival/Antiapoptosis In Vitro in Response to Growth Factor Withdrawal and Enhances Myelopoiesis In Vivo. *J. Immunol.* *170*, 421–429.
- Bruin, A.M. de, Demirel, Ö., Hooibrink, B., Brandts, C.H., and Nolte, M.A. (2013). Interferon-γ impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood* *121*, 3578–3585.

- Buckner, C.D., Epstein, R.B., Rudolph, R.H., Clift, R.A., Storb, R., and Thomas, E.D. (2001). Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. 1970. *J. Hematother. Stem Cell Res.* *10*, 201–208.
- Buhlmann, J.E., Gonzalez, M., Ginther, B., Panoskaltis-Mortari, A., Blazar, B.R., Greiner, D.L., Rossini, A.A., Flavell, R., and Noelle, R.J. (1999). Cutting edge: sustained expansion of CD8<sup>+</sup> T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 4373–4376.
- Butler, J.M., Nolan, D.J., Vertes, E.L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A.T., Seandel, M., Shido, K., White, I.A., Kobayashi, M., et al. (2010). Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* *6*, 251–264.
- Buza-Vidas, N., Cheng, M., Duarte, S., Nozad, H., Jacobsen, S.E.W., and Sitnicka, E. (2007). Crucial role of FLT3 ligand in immune reconstitution after bone marrow transplantation and high-dose chemotherapy. *Blood* *110*, 424–432.
- 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. (2005). 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.
- Carpino, N., Thierfelder, W.E., Chang, M., Saris, C., Turner, S.J., Ziegler, S.F., and Ihle, J.N. (2004). Absence of an Essential Role for Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor in Murine B-Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2584–2592.
- Castermans, E., Hannon, M., Dutrieux, J., Humblet-Baron, S., Seidel, L., Cheynier, R., Willems, E., Gothot, A., Vanbellinghen, J.-F., Geenen, V., et al. (2011). Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* *96*, 298–306.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., and Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8<sup>-</sup> dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* *204*, 1653–1664.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., Saint-Vis, B. de, Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996). CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* *184*, 695–706.
- Cavins, J.A., Kasakura, S., Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. (1962). Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethylsulphoxide. *Blood* *20*, 730–734.

Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* *10*, 858–864.

Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3012–3017.

Chakraverty, R., and Sykes, M. (2007). The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood* *110*, 9–17.

Champlin, R.E., Passweg, J.R., Zhang, M.J., Rowlings, P.A., Pelz, C.J., Atkinson, K.A., Barrett, A.J., Cahn, J.Y., Drobyski, W.R., Gale, R.P., et al. (2000). T-cell depletion of bone marrow transplants for leukemia from donors other than HLA-identical siblings: advantage of T-cell antibodies with narrow specificities. *Blood* *95*, 3996–4003.

Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y., Huo, M.-R., Xu, L.-P., Liu, D.-H., Liu, K.-Y., and Huang, X.-J. (2012). Immune Reconstitution Following Unmanipulated HLA-Mismatched/Haploidentical Transplantation Compared with HLA-Identical Sibling Transplantation. *J. Clin. Immunol.* *32*, 268–280.

Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y., and Huang, X.-J. (2014). Immune Reconstitution after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 440–449.

Chen, B.J., Cui, X., Sempowski, G.D., and Chao, N.J. (2003). Growth hormone accelerates immune recovery following allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation in mice. *Exp. Hematol.* *31*, 953–958.

Chen, J., Lipovsky, K., Ellison, F.M., Calado, R.T., and Young, N.S. (2004). Bystander destruction of hematopoietic progenitor and stem cells in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Blood* *104*, 1671–1678.

Chen, J., Brandt, J.S., Ellison, F.M., Calado, R.T., and Young, N.S. (2005). Defective stromal cell function in a mouse model of infusion-induced bone marrow failure. *Exp. Hematol.* *33*, 901–908.

Chen, M., Felix, K., and Wang, J. (2012). Critical role for perforin and Fas-dependent killing of dendritic cells in the control of inflammation. *Blood* *119*, 127–136.

Chklovskaya, E., Jansen, W., Nissen, C., Lyman, S.D., Rahner, C., Landmann, L., and Wodnar-Filipowicz, A. (1999). Mechanism of Flt3 Ligand Expression in Bone Marrow Failure: Translocation From Intracellular Stores to the Surface of T Lymphocytes After Chemotherapy-Induced Suppression of Hematopoiesis. *Blood* *93*, 2595–2604.

Chklovskaya, E., Nissen, C., Landmann, L., Rahner, C., Pfister, O., and Wodnar-Filipowicz, A. (2001). Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by

common cytokine receptor  $\gamma$ -chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood* 97, 1027–1034.

Chklovskaja, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M., and Wodnar-Filipowicz, A. (2004). Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* 103, 3860–3868.

Cho, J.-H., Boyman, O., Kim, H.-O., Hahm, B., Rubinstein, M.P., Ramsey, C., Kim, D.M., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8<sup>+</sup> cells driven by IL-2. *J. Exp. Med.* 204, 1787–1801.

Cho, J.-H., Kim, H.-O., Surh, C.D., and Sprent, J. (2010). T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis. *Immunity* 32, 214–226.

Choi, S.W., Gatza, E., Hou, G., Sun, Y., Whitfield, J., Song, Y., Oravecz-Wilson, K., Tawara, I., Dinarello, C.A., and Reddy, P. (2015). Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans. *Blood* 125, 815–819.

Chou, J.F., Kernan, N.A., Prockop, S., Heller, G., Scaradavou, A., Kobos, R., Knowles, M.A., Papadopoulos, E.B., Casson, A., Copeland, C., et al. (2011). Safety and Immunogenicity of the Live Attenuated Varicella Vaccine Following T Replete or T Cell-Depleted Related and Unrelated Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (alloHCT). *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 1708–1713.

Chung, B., Barbara-Burnham, L., Barsky, L., and Weinberg, K. (2001). Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood* 98, 1601–1606.

Chung, B., Dudl, E., Toyama, A., Barsky, L., and Weinberg, K.I. (2008). Importance of Interleukin-7 in the Development of Experimental Graft-Versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 16–27.

Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., Hollander, N.S. den, Kant, S.G., et al. (2008). Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell* 135, 37–48.

Collins, R.H., Jr, Shpilberg, O., Drobyski, W.R., Porter, D.L., Giralt, S., Champlin, R., Goodman, S.A., Wolff, S.N., Hu, W., Verfaillie, C., et al. (1997). Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 15, 433–444.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219–1226.

Cooke, K.R., Gerbitz, A., Crawford, J.M., Teshima, T., Hill, G.R., Tesolin, A., Rossignol, D.P., and Ferrara, J.L. (2001). LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-

versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* *107*, 1581–1589.

Couriel, D.R., Saliba, R.M., Giralt, S., Khouri, I., Andersson, B., de Lima, M., Hosing, C., Anderlini, P., Donato, M., Cleary, K., et al. (2004). Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *10*, 178–185.

Crozat, K., Guiton, R., Guilliams, M., Henri, S., Baranek, T., Schwartz-Cornil, I., Malissen, B., and Dalod, M. (2010a). Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* *234*, 177–198.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Manh, T.-P.V., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., et al. (2010b). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1283–1292.

Dadi, H., Ke, S., and Roifman, C.M. (1994). Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by ligation of the interleukin-7 receptor is dependent on protein tyrosine kinase activity. *Blood* *84*, 1579–1586.

Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., Margalit, R., Zsak, M., Nagler, A., Hardan, I., et al. (2005). Chemokine receptor CXCR4–dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat. Immunol.* *6*, 1038–1046.

Datta, S., and Sarvetnick, N.E. (2008). IL-21 Limits Peripheral Lymphocyte Numbers through T Cell Homeostatic Mechanisms. *PLoS ONE* *3*, e3118.

Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B., and Greenberg, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* *6*, 41–51.

Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* *20*, 156–166.

Dean, R.M., Fry, T., Mackall, C., Steinberg, S.M., Hakim, F., Fowler, D., Odom, J., Foley, J., Gress, R., and Bishop, M.R. (2008). Association of Serum Interleukin-7 Levels With the Development of Acute Graft-Versus-Host Disease. *J. Clin. Oncol.* *26*, 5735–5741.

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science* *307*, 1630–1634.

Delgado-Martin, C., Escibano, C., Pablos, J.L., Riol-Blanco, L., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2011). Chemokine CXCL12 Uses CXCR4 and a Signaling Core Formed by Bifunctional Akt, Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)1/2, and Mammalian Target of Rapamycin



Complex 1 (mTORC1) Proteins to Control Chemotaxis and Survival Simultaneously in Mature Dendritic Cells. *J. Biol. Chem.* *286*, 37222–37236.

Delisle, J.-S., Gaboury, L., Bélanger, M.-P., Tassé, E., Yagita, H., and Perreault, C. (2008). Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon-gamma receptor-deficient hosts. *Blood* *112*, 2111–2119.

Dertschnig, S., Hauri-Hohl, M.M., Vollmer, M., Holländer, G.A., and Krenger, W. (2015). Impaired thymic expression of tissue-restricted antigens licenses the de novo generation of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells during murine acute GVHD. *Blood* *118*, 5972–5974.

van Dijken, P., Wimperis, J., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L. (1991). Effect of graft-versus-host disease on hematopoiesis after bone marrow transplantation in mice. *Blood* *78*, 2773–2779.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231–235.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457–462.

DiSanto, J.P., Müller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 377–381.

Do, J., and Min, B. (2009a). Differential requirements of MHC and of DCs for endogenous proliferation of different T-cell subsets in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20394–20398.

Do, J., and Min, B. (2009b). IL-15 produced and trans-presented by DCs underlies homeostatic competition between CD8 and  $\gamma\delta$  T cells in vivo. *Blood* *113*, 6361–6371.

Domínguez, P.M., and Ardavín, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* *234*, 90–104.

Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* *31*, 823–833.

Drobyski, W.R., and Majewski, D. (1996). Treatment of donor mice with an alpha beta T-cell receptor monoclonal antibody induces prolonged T-cell nonresponsiveness and effectively prevents lethal graft-versus-host disease in murine recipients of major histocompatibility complex (MHC)-matched and MHC-mismatched donor marrow grafts. *Blood* *87*, 5355–5369.

Dudley, M.E., Yang, J.C., Sherry, R., Hughes, M.S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P.F., Huang, J., Citrin, D.E., Leitman, S.F., et al. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 5233–5239.

- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107–111.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L.M., and Teshima, T. (2004). Host Dendritic Cells Alone Are Sufficient to Initiate Acute Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol.* 172, 7393–7398.
- Dulude, G., Roy, D.C., and Perreault, C. (1999). The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J. Exp. Med.* 189, 1329–1342.
- Durand, M., and Segura, E. (2015). The known unknowns of the human dendritic cell network. *Antigen Present. Cell Biol.* 6, 129.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *J. Immunol.* 165, 6037–6046.
- Ebens, C.L., and Maillard, I. (2013). Notch signaling in hematopoietic cell transplantation and T cell alloimmunity. *Blood Rev.* 27, 269–277.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., et al. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ + conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823–836.
- Edwards, A.D., Diebold, S.S., Slack, E.M.C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., and Sousa, C.R. e (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 $\alpha$ + DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* 33, 827–833.
- Epstein, R.B., Storb, R., Ragde, H., and Thomas, E.D. (1968). Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* 6, 45–58.
- Epstein, R.B., Storb, R., Clift, R.A., and Thomas, E.D. (1969). Transplantation of stored allogeneic bone marrow in dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* 8, 496–501.
- Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, 173–181.
- Ezzone, S.A. (2009). History of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Semin. Oncol. Nurs.* 25, 95–99.
- Facchetti, F., Vermi, W., Mason, D., and Colonna, M. (2003). The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch.* 443, 703–717.

Falkenburg, J.H.F., and Warren, E.H. (2011). Graft versus Leukemia Reactivity after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, S33–S38.

Faßrinner, F., Wobus, M., Duryagina, R., Müller, K., Stopp, S., Wehner, R., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Schmitz, M., and Bornhäuser, M. (2012). Differential effects of mixed lymphocyte reaction supernatant on human mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* 40, 934–944.

Federmann, B., Hägele, M., Pfeiffer, M., Wirths, S., Schumm, M., Faul, C., Vogel, W., Handgretinger, R., Kanz, L., and Bethge, W.A. (2011). Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia* 25, 121–129.

Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., VanDeusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., and Caligiuri, M.A. (2001). Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 193, 219–231.

Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *The Lancet* 373, 1550–1561.

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. (2004). 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.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* 311, 83–87.

Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., Andrian, U.H. von, and Wagner, D.D. (1998). Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 14423–14428.

Fry, T.J., Sinha, M., Milliron, M., Chu, Y.-W., Kapoor, V., Gress, R.E., Thomas, E., and Mackall, C.L. (2004). Flt3 ligand enhances thymic-dependent and thymic-independent immune reconstitution. *Blood* 104, 2794–2800.

Fu, Y.W., Wu, D.P., Cen, J.N., Feng, Y.F., Chang, W.R., Zhu, Z.L., Qiu, Q.C., and Zhu, P. (2007). Patterns of T-cell reconstitution by assessment of T-cell receptor excision circle and T-cell receptor clonal repertoire after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in leukemia patients – a study in Chinese patients. *Eur. J. Haematol.* 79, 138–145.

Fujimaki, K., Maruta, A., Yoshida, M., Kodama, F., Matsuzaki, M., Fujisawa, S., Kanamori, H., and Ishigatsumo, Y. (2001). Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 27, 1275–1281.

Fujita, N., Sato, S., Katayama, K., and Tsuruo, T. (2002). Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* *277*, 28706–28713.

Gagnon, J., Chen, X.L., Forand-Boulerice, M., Leblanc, C., Raman, C., Ramanathan, S., and Ilangumaran, S. (2010). Increased antigen responsiveness of naive CD8 T cells exposed to IL-7 and IL-21 is associated with decreased CD5 expression. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 451–460.

Garvy, B.A., Elia, J.M., Hamilton, B.L., and Riley, R.L. (1993). Suppression of B-cell development as a result of selective expansion of donor T cells during the minor H antigen graft-versus-host reaction. *Blood* *82*, 2758–2766.

Gatti, R.A., Meuwissen, H.J., Allen, H.D., Hong, R., and Good, R.A. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* *2*, 1366–1369.

Gatza, E., Braun, T., Levine, J.E., Ferrara, J.L.M., Zhao, S., Wang, T., Chang, L., Harris, A., Pawarode, A., Kitko, C., et al. (2014). Etanercept plus Topical Corticosteroids as Initial Therapy for Grade One Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 1426–1434.

Ge, Q., Rao, V.P., Cho, B.K., Eisen, H.N., and Chen, J. (2001). Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 1728–1733.

Gerdemann, U., Katari, U.L., Papadopoulou, A., Keirnan, J.M., Craddock, J.A., Liu, H., Martinez, C.A., Kennedy-Nasser, A., Leung, K.S., Gottschalk, S.M., et al. (2013). Safety and clinical efficacy of rapidly-generated trivirus-directed T cells as treatment for adenovirus, EBV, and CMV infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mol. Ther.* *21*, 2113–2121.

Ghosh, H.S., Cisse, B., Bunin, A., Lewis, K.L., and Reizis, B. (2010). Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* *33*, 905–916.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.

Ginhoux, F., and Merad, M. (2010). Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 387–392.

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103<sup>+</sup> DCs. *J. Exp. Med.* *206*, 3115–3130.

Glas, A.M., van Montfort, E.H.N., Storek, J., Green, E.-G.N., Drissen, R.P.M., Bechtold, V.J., Reilly, J.Z., Dawson, M.A., and Milner, E.C.B. (2000). B-cell–autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. *Blood* *96*, 1064–1069.

- Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Low-Affinity Ligands for the TCR Drive Proliferation of Mature CD8<sup>+</sup> T Cells in Lymphopenic Hosts. *Immunity* 11, 183–190.
- Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., and Bevan, M.J. (2000). Naive T Cells Transiently Acquire a Memory-like Phenotype during Homeostasis-Driven Proliferation. *J. Exp. Med.* 192, 557–564.
- Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E.A. (2002). Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Exp. Med.* 195, 1515–1522.
- Goldrath, A.W., Luckey, C.J., Park, R., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16885–16890.
- Good, R.A., Dalmaso, A.P., Martinez, C., Archer, O.K., Pierce, J.C., and Papermaster, B.W. (1962). The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J. Exp. Med.* 116, 773–796.
- Gorski, J., Yassai, M., Zhu, X., Kissela, B., Kissela, B.] K.B. [corrected to, Keever, C., and Flomenberg, N. (1994). Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J. Immunol.* 152, 5109–5119.
- Gorski, J., Chen, X., Gendelman, M., Yassai, M., Krueger, A., Tivol, E., Logan, B., Komorowski, R., Vodanovic-Jankovic, S., and Drobyski, W.R. (2007). Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood* 109, 5502–5510.
- Goswami, R., and Kaplan, M.H. (2011). A Brief History of IL-9. *J. Immunol.* 186, 3283–3288.
- Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpeitz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227–230.
- Greinix, H.T., Knobler, R.M., Worel, N., Schneider, B., Schneeberger, A., Hoecker, P., Mitterbauer, M., Rabitsch, W., Schulenburg, A., and Kalhs, P. (2006). The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* 91, 405–408.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., et al. (2012). GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* 36, 1031–1046.
- Grossman, Z., and Paul, W.E. (2001). Autoreactivity, dynamic tuning and selectivity. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 687–698.

Gruber, A., and Brocker, T. (2005). MHC Class I-Positive Dendritic Cells (DC) Control CD8 T Cell Homeostasis In Vivo: T Cell Lymphopenia as a Prerequisite for DC-Mediated Homeostatic Proliferation of Naive CD8 T Cells. *J. Immunol.* 175, 201–206.

Grütz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 77, 3–15.

Guarda, G., Hons, M., Soriano, S.F., Huang, A.Y., Polley, R., Martín-Fontecha, A., Stein, J.V., Germain, R.N., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat. Immunol.* 8, 743–752.

Gueller, S., Allwin, R., Mousset, S., Martin, H., Wieters, I., Herrmann, E., Serve, H., Bickel, M., and Bug, G. (2011). Enhanced Immune Response after a Second Dose of an AS03-Adjuvanted H1N1 Influenza A Vaccine in Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 1546–1550.

Guimond, M., Balassy, A., Barrette, M., Brochu, S., Perreault, C., and Roy, D.C. (2002). P-glycoprotein targeting: a unique strategy to selectively eliminate immunoreactive T cells. *Blood* 100, 375–382.

Guimond, M., Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2005). Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J. Immunother.* Hagerstown Md 1997 28, 289–294.

Guimond, M., Veenstra, R.G., Grindler, D.J., Zhang, H., Cui, Y., Murphy, R.D., Kim, S.Y., Na, R., Hennighausen, L., Kurtulus, S., et al. (2009). Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 10, 149–157.

Guo, Y., Hangoc, G., Bian, H., Pelus, L.M., and Broxmeyer, H.E. (2005). SDF-1/CXCL12 Enhances Survival and Chemotaxis of Murine Embryonic Stem Cells and Production of Primitive and Definitive Hematopoietic Progenitor Cells. *STEM CELLS* 23, 1324–1332.

Gyurkocza, B., and Sandmaier, B.M. (2014). Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood* 124, 344–353.

Haan, J.M.M. den, Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). Cd8+ but Not Cd8– Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685–1696.

Haarberg, K.M.K., Li, J., Heinrichs, J., Wang, D., Liu, C., Bronk, C.C., Kaosaard, K., Owyang, A.M., Holland, S., Masuda, E., et al. (2013). Pharmacologic inhibition of PKC $\alpha$  and PKC $\theta$  prevents GVHD while preserving GVL activity in mice. *Blood* 122, 2500–2511.

Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.-S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., et al. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* 4, 380–386.

- Hakim, F.T., Cepeda, R., Gray, G.S., June, C.H., and Abe, R. (1995). Acute graft-versus-host reaction can be aborted by blockade of costimulatory molecules. *J. Immunol. Baltim. Md* *155*, 1757–1766.
- Haluszczak, C., Akue, A.D., Hamilton, S.E., Johnson, L.D.S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S.C., and Kedl, R.M. (2009). The antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* *206*, 435–448.
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *365*, 127–138.
- Hamilton, S.E., Wolkers, M.C., Schoenberger, S.P., and Jameson, S.C. (2006). The generation of protective memory-like CD8<sup>+</sup> T cells during homeostatic proliferation requires CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* *7*, 475–481.
- Han, P., Goularte, O.D., Rufner, K., Wilkinson, B., and Kaye, J. (2004). An Inhibitory Ig Superfamily Protein Expressed by Lymphocytes and APCs Is Also an Early Marker of Thymocyte Positive Selection. *J. Immunol.* *172*, 5931–5939.
- Hao, Y., Legrand, N., and Freitas, A.A. (2006). The clone size of peripheral CD8 T cells is regulated by TCR promiscuity. *J. Exp. Med.* *203*, 1643–1649.
- Hashimoto, D., Asakura, S., Matsuoka, K., Sakoda, Y., Koyama, M., Aoyama, K., Tanimoto, M., and Teshima, T. (2007). FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *Eur. J. Immunol.* *37*, 271–281.
- Hataye, J., Moon, J.J., Khoruts, A., Reilly, C., and Jenkins, M.K. (2006). Naive and memory CD4<sup>+</sup> T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* *312*, 114–116.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* *10*, 1237–1244.
- Heining, C., Spyridonidis, A., Bernhardt, E., Schulte-Monting, J., Behringer, D., Grulich, C., Jakob, A., Bertz, H., and Finke, J. (2007). Lymphocyte reconstitution following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective study including 148 patients. *Bone Marrow Transpl.* *39*, 613–622.
- Hennion-Tscheltzoff, O., Leboeuf, D., Gauthier, S.-D., Dupuis, M., Assouline, B., Grégoire, A., Thiant, S., and Guimond, M. (2013). TCR triggering modulates the responsiveness and homeostatic proliferation of CD4<sup>+</sup> thymic emigrants to IL-7 therapy. *Blood* *121*, 4684–4693.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *J. Immunol.* *167*, 741–748.

Hernández-López, C., Valencia, J., Hidalgo, L., Martínez, V.G., Zapata, A.G., Sacedón, R., Varas, A., and Vicente, A. (2008). CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol. Lett.* *120*, 72–78.

Hervé, P., Cahn, J.Y., Flesch, M., Plouvier, E., Racadot, E., Noir, A., Couteret, Y., Goldstein, G., Bernard, A., and Lenys, R. (1987). Successful graft-versus-host disease prevention without graft failure in 32 HLA-identical allogeneic bone marrow transplantations with marrow depleted of T cells by monoclonal antibodies and complement. *Blood* *69*, 388–393.

Heslop, H.E., Slobod, K.S., Pule, M.A., Hale, G.A., Rousseau, A., Smith, C.A., Bollard, C.M., Liu, H., Wu, M.-F., Rochester, R.J., et al. (2010). Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* *115*, 925–935.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* *322*, 1097–1100.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). 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.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L. (1997). Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* *90*, 3204–3213.

Holtan, S.G., Pasquini, M., and Weisdorf, D.J. (2014). Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood* *124*, 363–373.

Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* *434*, 1035–1040.

Horowitz, M., Gale, R., Sondel, P., Goldman, J., Kersey, J., Kolb, H., Rimm, A., Ringden, O., Rozman, C., and Speck, B. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* *75*, 555–562.

Horváth, R., Budinský, V., Kayserová, J., Kalina, T., Formánková, R., Starý, J., Bartůnková, J., Sedláček, P., and Spísek, R. (2009). Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *131*, 60–69.

Hromas, R., Cornetta, K., Srour, E., Blanke, C., and Broun, E.R. (1994). Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation [letter]. *Blood* *84*, 1689–1690.



- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M., and Lio, C.-W.J. (2012). Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 157–167.
- Huang, T., Wei, B., Velazquez, P., Borneman, J., and Braun, J. (2005). Commensal microbiota alter the abundance and TCR responsiveness of splenic naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *117*, 221–230.
- Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A Is a Novel Activation C-type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3<sup>+</sup> Dendritic Cells and a Subset of Monocytes. *J. Biol. Chem.* *283*, 16693–16701.
- Ianni, M.D., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Papa, B.D., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., et al. (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* *117*, 3921–3928.
- Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4<sup>+</sup> dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3909–3914.
- Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C.G., and Steinman, R.M. (2009). Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 1524–1529.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* *176*, 1693–1702.
- Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaech, S.M., Miller, J.D., et al. (2005). Effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* *6*, 1236–1244.
- Iolyeva, M., Aebischer, D., Proulx, S.T., Willrodt, A.-H., Ecoiffier, T., Häner, S., Bouchaud, G., Krieg, C., Onder, L., Ludewig, B., et al. (2013). Interleukin-7 is produced by afferent lymphatic vessels and supports lymphatic drainage. *Blood* *122*, 2271–2281.
- Isaksen, D.E., Baumann, H., Trobridge, P.A., Farr, A.G., Levin, S.D., and Ziegler, S.F. (1999). Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *163*, 5971–5977.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *5*, 987–995.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8<sup>+</sup> Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 1289–1302.

- Jacobson, L.O., and Marks, E.K. (1949). The role of the spleen in radiation injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 70, 740–742.
- Jameson, S.C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2, 547–556.
- Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 513–533.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141<sup>+</sup> (BDCA-3)<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207, 1247–1260.
- Judge, A.D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C.D., and Sprent, J. (2002). Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 196, 935–946.
- Kabashima, K., Banks, T.A., Ansel, K.M., Lu, T.T., Ware, C.F., and Cyster, J.G. (2005). Intrinsic Lymphotoxin- $\beta$  Receptor Requirement for Homeostasis of Lymphoid Tissue Dendritic Cells. *Immunity* 22, 439–450.
- Kabashima, K., Sugita, K., Shiraishi, N., Tamamura, H., Fujii, N., and Tokura, Y. (2007). CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 1012–1016.
- Kanakry, C.G., Ganguly, S., Zahurak, M., Bolaños-Meade, J., Thoburn, C., Perkins, B., Fuchs, E.J., Jones, R.J., Hess, A.D., and Luznik, L. (2013). Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci. Transl. Med.* 5, 211ra157.
- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Manz, M.G. (2003). Flt3 Ligand Regulates Dendritic Cell Development from Flt3<sup>+</sup> Lymphoid and Myeloid-committed Progenitors to Flt3<sup>+</sup> Dendritic Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* 198, 305–313.
- Kashiwada, M., Pham, N.-L.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 $\alpha^+$  dendritic cell development. *Blood* 117, 6193–6197.
- Kassiotis, G., Zamoyska, R., and Stockinger, B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* 197, 1007–1016.
- Katsanis, E., Xu, Z., Panoskaltsis-Mortari, A., Weisdorf, D.J., Widmer, M.B., and Blazar, B.R. (1996). IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice. *Transplantation* 62, 872–875.

- Kekre, N., and Antin, J.H. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood* *124*, 334–343.
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med.* *191*, 771–780.
- Kernan, N.A., Collins, N.H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B., and O’Reilly, R.J. (1986). Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* *68*, 770–773.
- Kershaw, M.H., Westwood, J.A., and Darcy, P.K. (2013). Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 525–541.
- Kielsen, K., Jordan, K.K., Uhlving, H.H., Pontoppidan, P.L., Shamim, Z., Ifversen, M., Heilmann, C., Nielsen, C.H., Sengeløv, H., Ryder, L.P., et al. (2015). T cell Reconstitution in Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Significance of Plasma Interleukin-7. *Scand. J. Immunol.* *81*, 72–80.
- Kieper, W.C., Tan, J.T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C.D. (2002). Overexpression of Interleukin (IL)-7 Leads to IL-15-independent Generation of Memory Phenotype CD8+ T Cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1533–1539.
- Kieper, W.C., Burghardt, J.T., and Surh, C.D. (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 40–44.
- Kieper, W.C., Troy, A., Burghardt, J.T., Ramsey, C., Lee, J.Y., Jiang, H.-Q., Dummer, W., Shen, H., Cebra, J.J., and Surh, C.D. (2005). Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3158–3163.
- Kim, N., Im, K.-I., Lim, J.-Y., Jeon, E.-J., Nam, Y.-S., Kim, E.-J., and Cho, S.-G. (2013). Mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of graft-versus-host disease: experiments and practice. *Ann. Hematol.* *92*, 1295–1308.
- King, C., Ilic, A., Koelsch, K., and Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* *117*, 265–277.
- King, I.L., Kroenke, M.A., and Segal, B.M. (2010). GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J. Exp. Med.* *207*, 953–961.
- Kingston, D., Schmid, M.A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., and Manz, M.G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* *114*, 835–843.

- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 833–844.
- Klyuchnikov, E., Asenova, S., Kern, W., Kilinc, G., Ayuk, F., Wiedemann, B., Lioznov, M., Freiberger, P., Zalyalov, Y., Zander, A.R., et al. (2010). Post-transplant immune reconstitution after unrelated allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* *51*, 1450–1463.
- Kohara, H., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Noda, M., Fujii, N., and Nagasawa, T. (2007). Development of Plasmacytoid Dendritic Cells in Bone Marrow Stromal Cell Niches Requires CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling. *Blood* *110*, 4153–4160.
- Kohrt, H.E., Müller, A., Baker, J., Goldstein, M.J., Newell, E., Dutt, S., Czerwinski, D., Lowsky, R., and Strober, S. (2011). Donor immunization with WT1 peptide augments antileukemic activity after MHC-matched bone marrow transplantation. *Blood* *118*, 5319–5329.
- Kolb, H.-J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* *112*, 4371–4383.
- Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., et al. (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* *86*, 2041–2050.
- Korngold, R., and Sprent, J. (1983). Lethal GVHD across minor histocompatibility barriers: nature of the effector cells and role of the H-2 complex. *Immunol. Rev.* *71*, 5–29.
- Koyama, M., Hashimoto, D., Aoyama, K., Matsuoka, K., Karube, K., Niino, H., Harada, M., Tanimoto, M., Akashi, K., and Teshima, T. (2009). Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* *113*, 2088–2095.
- Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Don, A.L.J., Lineburg, K.E., Cheong, M., Robb, R.J., Markey, K.A., et al. (2012). Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat. Med.* *18*, 135–142.
- Krenger, W., Blazar, B.R., and Holländer, G.A. (2011). Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *117*, 6768–6776.
- Krieg, C., Boyman, O., Fu, Y.-X., and Kaye, J. (2007). B and T lymphocyte attenuator regulates CD8<sup>+</sup> T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* *8*, 162–171.
- Krupica, T., Jr, Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2006). Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *120*, 121–128.

- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* *502*, 637–643.
- Labrecque, N., Whitfield, L.S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* *15*, 71–82.
- Lai, S.Y., Molden, J., and Goldsmith, M.A. (1997). Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex. A molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* *99*, 169–177.
- Langner, S., Staber, P.B., Schub, N., Gramatzki, M., Grothe, W., Behre, G., Rabitsch, W., Urban, C., Linkesch, W., and Neumeister, P. (2008). Palifermin reduces incidence and severity of oral mucositis in allogeneic stem-cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* *42*, 275–279.
- Lantz, O., Grandjean, I., Matzinger, P., and Di Santo, J.P. (2000).  $\gamma$  chain required for naïve CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat. Immunol.* *1*, 54–58.
- Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* *106*, 1901–1910.
- Le, R.Q., Melenhorst, J.J., Battiwalla, M., Hill, B., Memon, S., Savani, B.N., Shenoy, A., Hensel, N.F., Koklanaris, E.K., Keyvanfar, K., et al. (2011). Evolution of the donor T-cell repertoire in recipients in the second decade after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *117*, 5250–5256.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* [jem.20141442](https://doi.org/10.1084/jem.20141442).
- Lee, R.S., Kuhr, C.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Hogan, W.J., Storb, R., and Little, M.-T. (2003). FTY720 does not abrogate acute graft-versus-host disease in the dog leukocyte antigen-nonidentical unrelated canine model. *Transplantation* *76*, 1155–1158.
- Lee, Y., Gotoh, A., Kwon, H.-J., You, M., Kohli, L., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., et al. (2002). Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* *99*, 4307–4317.
- Leen, A.M., Christin, A., Myers, G.D., Liu, H., Cruz, C.R., Hanley, P.J., Kennedy-Nasser, A.A., Leung, K.S., Gee, A.P., Krance, R.A., et al. (2009). Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* *114*, 4283–4292.

- Leitão, C., Freitas, A.A., and Garcia, S. (2009). The role of TCR specificity and clonal competition during reconstruction of the peripheral T cell pool. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 5232–5239.
- Lenz, D.C., Kurz, S.K., Lemmens, E., Schoenberger, S.P., Sprent, J., Oldstone, M.B.A., and Homann, D. (2004). IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9357–9362.
- Leveson-Gower, D.B., Olson, J.A., Segal, E.I., Luong, R.H., Baker, J., Zeiser, R., and Negrin, R.S. (2011). Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4–dependent mechanism. *Blood* *117*, 3220–3229.
- Levine, J.E., Uberti, J.P., Ayash, L., Reynolds, C., Ferrara, J.L. m, Silver, S.M., Braun, T., Yanik, G., Hutchinson, R., and Ratanatharathorn, V. (2003). Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *9*, 189–197.
- Levine, J.E., Blazar, B.R., DeFor, T., Ferrara, J.L.M., and Weisdorf, D.J. (2008). Long-Term follow-up of a Phase I/II Randomized, Placebo-Controlled Trial of Palifermin to Prevent Graft-versus-Host Disease (GVHD) after Related Donor Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (HCT). *Biol. Blood Marrow Transplant.* *14*, 1017–1021.
- Lewis, K.L., Caton, M.L., Bogunovic, M., Greter, M., Grajkowska, L.T., Ng, D., Klinakis, A., Charo, I.F., Jung, S., Gommerman, J.L., et al. (2011). Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* *35*, 780–791.
- Li, H.W., and Sykes, M. (2012). Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 403–416.
- Li, H., Demetris, A.J., McNiff, J., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Rothstein, D.M., Lakkis, F.G., and Shlomchik, W.D. (2012). Profound Depletion of Host Conventional Dendritic Cells, Plasmacytoid Dendritic Cells, and B Cells Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease Induction. *J. Immunol.* *188*, 3804–3811.
- Li, J., Semple, K., Suh, W.-K., Liu, C., Chen, F., Blazar, B.R., and Yu, X.-Z. (2011a). Roles of CD28, CTLA4, and Inducible Costimulator in Acute Graft-versus-Host Disease in Mice. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *17*, 962–969.
- Li, N., Matte-Martone, C., Zheng, H., Cui, W., Venkatesan, S., Tan, H.S., McNiff, J., Demetris, A.J., Roopenian, D., Kaech, S., et al. (2011b). Memory T cells from minor histocompatibility antigen–vaccinated and virus-immune donors improve GVL and immune reconstitution. *Blood* *118*, 5965–5976.
- Li, W.Q., Jiang, Q., Khaled, A.R., Keller, J.R., and Durum, S.K. (2004). Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J. Biol. Chem.* *279*, 29160–29166.

- Lim, J.-Y., Park, M.-J., Im, K.-I., Kim, N., Park, H.-S., Lee, S.-H., Kim, E.-K., Nam, Y.-S., Lee, E.-S., Cho, M.-L., et al. (2015). Interleukin 21 blockade modulates activated T- and B-cell homeostasis via B-cell activating factor pathway-mediated inhibition in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Exp. Hematol.* *43*, 23–31.e2.
- Lin, J.X., Migone, T.S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J.A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E.T., Mietz, J., and John, S. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* *2*, 331–339.
- Lin, K.L., Fulton, L.M., Berginski, M., West, M.L., Taylor, N.A., Moran, T.P., Coghill, J.M., Blazar, B.R., Bear, J.E., and Serody, J.S. (2014). Intravital imaging of donor allogeneic effector and regulatory T cells with host dendritic cells during GVHD. *Blood* *123*, 1604–1614.
- Lin, S.-J., Cheng, P.-J., Yan, D.-C., Lee, P.-T., and Hsaio, H.-S. (2006). Effect of interleukin-15 on alloreactivity in umbilical cord blood. *Transpl. Immunol.* *16*, 112–116.
- Linhares, Y.P.L., Pavletic, S., and Gale, R.P. (2013). Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help? *Bone Marrow Transplant.* *48*, 203–209.
- Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1255–1265.
- Lischke, A., Moriggl, R., Brändlein, S., Berchtold, S., Kammer, W., Sebald, W., Groner, B., Liu, X., Hennighausen, L., and Friedrich, K. (1998). The Interleukin-4 Receptor Activates STAT5 by a Mechanism That Relies upon Common  $\gamma$ -Chain. *J. Biol. Chem.* *273*, 31222–31229.
- Little, M.-T., and Storb, R. (2002). History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* *2*, 231–238.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* *234*, 45–54.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2002). Immune Tolerance After Delivery of Dying Cells to Dendritic Cells In Situ. *J. Exp. Med.* *196*, 1091–1097.
- Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* *324*, 392–397.
- Liu, Y.-J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.-H., Malefyt, R. de W., Omori, M., Zhou, B., and Ziegler, S.F. (2007). TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 193–219.

- Lochte, H.L., Jr, Levy, A.S., Guenther, D.M., Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. (1962). Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature* *196*, 1110–1111.
- Loiseau, P., Busson, M., Balere, M.-L., Dormoy, A., Bignon, J.-D., Gagne, K., Gebuhrer, L., Dubois, V., Jollet, I., Bois, M., et al. (2007). 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. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *13*, 965–974.
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., and Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* *12*, 197–201.
- Loyer, V., Fontaine, P., Pion, S., Héту, F., Roy, D.C., and Perreault, C. (1999). The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 6462–6467.
- Lynch, H.E., Goldberg, G.L., Chidgey, A., Van den Brink, M.R.M., Boyd, R., and Sempowski, G.D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* *30*, 366–373.
- Ma, H., Lu, C., Ziegler, J., Liu, A., Sepulveda, A., Okada, H., Lentzsch, S., and Mapara, M.Y. (2011). Absence of Stat1 in donor CD4+ T cells promotes the expansion of Tregs and reduces graft-versus-host disease in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 2554–2569.
- MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* *100*, 4512–4520.
- Mackall, C., Fry, T., Gress, R., Peggs, K., Storek, J., and Toubert, A. (2009). Background to hematopoietic cell transplantation, including post transplant immune recovery. *Bone Marrow Transplant.* *44*, 457–462.
- Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Horowitz, M.E., Magrath, I.T., Shad, A.T., and Steinberg, S.M. (1995). Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *332*, 143–149.
- Mackall, C.L., Bare, C.V., Granger, L.A., Sharrow, S.O., Titus, J.A., and Gress, R.E. (1996). Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4609–4616.
- MacMillan, M.L., Weisdorf, D.J., Wagner, J.E., DeFor, T.E., Burns, L.J., Ramsay, N.K.C., Davies, S.M., and Blazar, B.R. (2002). Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *8*, 387–394.



- MacMillan, M.L., Radloff, G.A., Kiffmeyer, W.R., DeFor, T.E., Weisdorf, D.J., and Davies, S.M. (2003). High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation. *Transplantation* 76, 1758–1762.
- Magenau, J., and Reddy, P. (2014). Next generation treatment of acute graft-versus-host disease. *Leukemia* 28, 2283–2291.
- Main, J.M., and Prehn, R.T. (1955). Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst.* 15, 1023–1029.
- Malhotra, D., Fletcher, A.L., Astarita, J., Lukacs-Kornek, V., Tayalia, P., Gonzalez, S.F., Elpek, K.G., Chang, S.K., Knoblich, K., Hemler, M.E., et al. (2012). Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat. Immunol.* 13, 499–510.
- Manfra, D.J., Chen, S.-C., Jensen, K.K., Fine, J.S., Wiekowski, M.T., and Lira, S.A. (2003). Conditional Expression of Murine Flt3 Ligand Leads to Expansion of Multiple Dendritic Cell Subsets in Peripheral Blood and Tissues of Transgenic Mice. *J. Immunol.* 170, 2843–2852.
- Mannick, J.A., Lochte, H.L., Jr, Ashley, C.A., Thomas, E.D., and Ferrebee, J.W. (1960). Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 15, 255–266.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333–3341.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184, 1953–1962.
- Markey, K.A., Banovic, T., Kuns, R.D., Olver, S.D., Don, A.L.J., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Raggatt, L.J., Pettit, A.R., Bromberg, J.S., et al. (2009). Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood* 113, 5644–5649.
- Markey, K.A., Koyama, M., Gartlan, K.H., Leveque, L., Kuns, R.D., Lineburg, K.E., Teal, B.E., MacDonald, K.P.A., and Hill, G.R. (2014). Cross-Dressing by Donor Dendritic Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Contributes to Formation of the Immunological Synapse and Maximizes Responses to Indirectly Presented Antigen. *J. Immunol.* 1302490.
- Marks, L., Altman, N.H., Podack, E.R., and Levy, R.B. (2004). Donor T cells lacking Fas ligand and perforin retain the capacity to induce severe GvHD in minor histocompatibility antigen mismatched bone-marrow transplantation recipients. *Transplantation* 77, 804–812.
- Markt, S., Magnani, Z., Ciceri, F., Cazzaniga, S., Riddell, S.R., Traversari, C., Bordignon, C., and Bonini, C. (2003). Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene

for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 101, 1290–1298.

Martin, B., Bécourt, C., Bienvenu, B., and Lucas, B. (2006). Self-recognition is crucial for maintaining the peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell pool in a nonlymphopenic environment. *Blood* 108, 270–277.

Martin, P.J., Schoch, G., Fisher, L., Byers, V., Anasetti, C., Appelbaum, F.R., Beatty, P.G., Doney, K., McDonald, G.B., and Sanders, J.E. (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 76, 1464–1472.

Martinez-Jaramillo, G., Gomez-Morales, E., Sanchez-Valle, E., and Mayani, H. (2001). Severe Hematopoietic Alterations In Vitro, in Bone Marrow Transplant Recipients Who Develop Graft-Versus-Host Disease. *J. Hematotherapy Htmletp Glyphamp Asciiamp Stem Cell Res.* 10, 347–354.

Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., et al. (2011). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 that Controls Acute Infection by *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Immunity* 35, 249–259.

Matte, C.C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B.E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2004). Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 10, 987–992.

Matte-Martone, C., Liu, J., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2008). CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> T cells require cognate interactions with target tissues to mediate GVHD across only minor H antigens, whereas both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells require direct leukemic contact to mediate GVL. *Blood* 111, 3884–3892.

Maury, S., Rosenzweig, M., Redjoul, R., Marcais, A., Xhaard, A., Cherai, M., Cabanne, L., Churlaud, G., Suarez, F., Socié, G., et al. (2014). Lymphodepletion followed by infusion of suicide gene-transduced donor lymphocytes to safely enhance their antitumor effect: a phase I/II study. *Leukemia* 28, 2406–2410.

McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debré, P., Feuillard, J., and Hosmalin, A. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 97, 3470–3477.

McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., Smedt, T.D., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489–3497.

- Meiron, M., Zohar, Y., Anunu, R., Wildbaum, G., and Karin, N. (2008). CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *205*, 2643–2655.
- Melchionda, F., Fry, T.J., Milliron, M.J., McKirdy, M.A., Tagaya, Y., and Mackall, C.L. (2005). Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J. Clin. Invest.* *115*, 1177–1187.
- Mensen, A., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., Demski, S., Oey, M., Stroux, A., Hemmati, P., Westermann, J., Blau, O., Wittenbecher, F., et al. (2014). T-cell infiltration of the human bone marrow during acute GvHD is associated with impaired B-cell reconstitution and function after allogeneic-HSCT. *Blood*.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 563–604.
- Mertsching, E., Burdet, C., and Ceredig, R. (1995). IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *Int. Immunol.* *7*, 401–414.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 2731–2738.
- Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* *40*, 642–656.
- Miller, J.F.A.P. (2011). The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* *11*, 489–495.
- Miller, J.F., and Moreman, K.G. (1963). The role of the thymus in immunity. *Med. Biol. Illus.* *13*, 146–151.
- Miller, C.N., Hartigan-O'Connor, D.J., Lee, M.S., Laidlaw, G., Cornelissen, I.P., Matloubian, M., Coughlin, S.R., McDonald, D.M., and McCune, J.M. (2013). IL-7 production in murine lymphatic endothelial cells and induction in the setting of peripheral lymphopenia. *Int. Immunol.* *25*, 471–483.
- Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2005). Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6039–6044.
- Min, D., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Chung, B., Danilenko, D.M., Farrell, C., Lacey, D.L., Blazar, B.R., and Weinberg, K.I. (2002). Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* *99*, 4592–4600.
- Modiano, J.F., Johnson, L.D.S., and Bellgrau, D. (2008). Negative regulators in homeostasis of naïve peripheral T cells. *Immunol. Res.* *41*, 137–153.

- Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Bardou, V.-J., Gastaut, J.-A., Viens, P., Olive, D., and Gaugler, B. (2004). Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 19, 1–6.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203–213.
- Mori, T., Nishimura, T., Ikeda, Y., Hotta, T., Yagita, H., and Ando, K. (1998). Involvement of Fas-Mediated Apoptosis in the Hematopoietic Progenitor Cells of Graft-Versus-Host Reaction-Associated Myelosuppression. *Blood* 92, 101–107.
- Morris, S.C., Heidorn, S.M., Herbert, D.R., Perkins, C., Hildeman, D.A., Khodoun, M.V., and Finkelman, F.D. (2009). Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8+ T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 1429–1438.
- Moses, C.T., Thorstenson, K.M., Jameson, S.C., and Khoruts, A. (2003). Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1185–1190.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2013). Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 137–161.
- Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377–1381.
- Muranski, P., and Restifo, N.P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 200–208.
- Murphy, W.J., Durum, S.K., Anver, M.R., and Longo, D.L. (1992). Immunologic and hematologic effects of neuroendocrine hormones. Studies on DW/J dwarf mice. *J. Immunol.* 148, 3799–3805.
- Nagai, Y., Garrett, K.P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., and Kincaid, P.W. (2006). Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity* 24, 801–812.
- Nagasawa, T. (2014). CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J. Mol. Med.* 92, 433–439.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635–638.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keefe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional

dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217–1226.

Napolitano, L.A., Grant, R.M., Deeks, S.G., Schmidt, D., De Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herndier, B.G., Andersson, J., and McCune, J.M. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1–mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.* 7, 73–79.

Napolitano, L.A., Schmidt, D., Gotway, M.B., Ameli, N., Filbert, E.L., Ng, M.M., Clor, J.L., Epling, L., Sinclair, E., Baum, P.D., et al. (2008). Growth hormone enhances thymic function in HIV-1–infected adults. *J. Clin. Invest.*

Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeld, S., Facciotti, F., Guarini, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c<sup>+</sup> dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 122, 932–942.

Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fujii, N., and Nagasawa, T. (2011). CXCL12–CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood* 117, 451–458.

Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S.M., Ziegler, S.F., Tsang, M., Cao, X., and Leonard, W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262, 1877–1880.

Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2006). Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon–producing and dendritic cell development. *J. Exp. Med.* 203, 227–238.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup> plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207–1216.

Onder, L., Narang, P., Scandella, E., Chai, Q., Iolyeva, M., Hoorweg, K., Halin, C., Richie, E., Kaye, P., Westermann, J., et al. (2012). IL-7–producing stromal cells are critical for lymph node remodeling. *Blood* 120, 4675–4683.

Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671–676.

Or, R., Hadar, E., Bitan, M., Resnick, I.B., Aker, M., Ackerstein, A., Samuel, S., Tsirigotis, P., Gesundheit, B., Slavin, S., et al. (2006). Safety and Efficacy of Donor Lymphocyte Infusions following Mismatched Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 12, 1295–1301.

Ordemann, R., Hutchinson, R., Friedman, J., Burakoff, S.J., Reddy, P., Duffner, U., Braun, T.M., Liu, C., Teshima, T., and Ferrara, J.L.M. (2002). Enhanced allostimulatory activity of

host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *109*, 1249–1256.

Osborne, L.C., Dhanji, S., Snow, J.W., Priatel, J.J., Ma, M.C., Miners, M.J., Teh, H.-S., Goldsmith, M.A., and Abraham, N. (2007). Impaired CD8 T cell memory and CD4 T cell primary responses in IL-7R $\alpha$  mutant mice. *J. Exp. Med.* *204*, 619–631.

Ostiguy, V., Allard, È.-L., Marquis, M., Leignadier, J., and Labrecque, N. (2007). IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 645–656.

Oudshoorn, M., van Walraven, S.M., Bakker, J.N.A., Lie, J.L.W.T., v.d. Zanden, H.G.M., Heemskerk, M.B.A., and Claas, F.H.J. (2006). Hematopoietic Stem Cell Donor Selection: the Eurodonor Experience. *Hum. Immunol.* *67*, 405–412.

Pallard, C., Stegmann, A.P., van Kleffens, T., Smart, F., Venkitaraman, A., and Spits, H. (1999). Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* *10*, 525–535.

Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J.C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 4587–4595.

Panoskaltzis-Mortari, A., Taylor, P.A., Rubin, J.S., Uren, A., Welniak, L.A., Murphy, W.J., Farrell, C.L., Lacey, D.L., and Blazar, B.R. (2000). Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury. *Blood* *96*, 4350–4356.

Papadopoulos, E.B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M.H., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Gillio, A.P., Small, T.N., et al. (1994). Infusions of Donor Leukocytes to Treat Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *330*, 1185–1191.

Park, M., and Seo, J.J. (2012). Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Res.* *2012*.

Park, J.-H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., and Singer, A. (2004). Suppression of IL7R $\alpha$  transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* *21*, 289–302.

Parody, R., Martino, R., de la Cámara, R., García-Noblejas, A., Esquirol, A., Garcia-Cadenas, I., Villaescusa, T., Caballero, D., Rovira, M., Fernandez-Avilés, F., et al. (2015). Fungal and viral infections after allogeneic hematopoietic transplantation from unrelated donors in adults: improving outcomes over time. *Bone Marrow Transplant.* *50*, 274–281.

Paul, W.E. (2008). *Fundamental Immunology*, 6th edition.

- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Frantza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., et al. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289–3296.
- Perales, M.-A., Goldberg, J.D., Yuan, J., Koehne, G., Lechner, L., Papadopoulos, E.B., Young, J.W., Jakubowski, A.A., Zaidi, B., Gallardo, H., et al. (2012). Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cell recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 120, 4882–4891.
- Perez-Diez, A., Joncker, N.T., Choi, K., Chan, W.F.N., Anderson, C.C., Lantz, O., and Matzinger, P. (2007). CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 109, 5346–5354.
- Pérez-Simón, J.A., Díez-Campelo, M., Martino, R., Brunet, S., Urbano, A., Caballero, M.D., de León, A., Valcárcel, D., Carreras, E., del Cañizo, M.C., et al. (2005). Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br. J. Haematol.* 130, 394–403.
- Perez-Villar, J.J., Whitney, G.S., Bowen, M.A., Hewgill, D.H., Aruffo, A.A., and Kanner, S.B. (1999). CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2903–2912.
- Peric, Z., Cahu, X., Malard, F., Brissot, E., Chevallier, P., Guillaume, T., Gregoire, M., Gaugler, B., and Mohty, M. (2015). Peripheral blood plasmacytoid dendritic cells at day 100 can predict outcome after allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*
- Petersdorf, E.W. (2013). The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. *Blood* 122, 1863–1872.
- Pillai, A.B., George, T.I., Dutt, S., and Strober, S. (2009). Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* 113, 4458–4467.
- Plett, P.A., Frankovitz, S.M., Wolber, F.M., Abonour, R., and Orschell-Traycoff, C.M. (2002). Treatment of circulating CD34+ cells with SDF-1 $\alpha$  or anti-CXCR4 antibody enhances migration and NOD/SCID repopulating potential. *Exp. Hematol.* 30, 1061–1069.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How  $\alpha\beta$  T cells deal with induced TCR $\alpha$  ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8744–8749.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8– Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8+ Dendritic Cells. *J. Immunol.* 166, 5327–5330.

- Posevitz, V., Arndt, B., Krieger, T., Warnecke, N., Schraven, B., and Simeoni, L. (2008). Regulation of T Cell Homeostasis by the Transmembrane Adaptor Protein SIT. *J. Immunol.* *180*, 1634–1642.
- Poulin, L.F., Reyal, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Håkansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., et al. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* *119*, 6052–6062.
- Probst, H.C., Muth, S., and Schild, H. (2014). Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur. J. Immunol.* *44*, 927–933.
- Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 19869–19874.
- Puissant-Lubrano, B., Huynh, A., Attal, M., and Blancher, A. (2014). Evolution of peripheral blood T lymphocyte subsets after allogenic or autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiology* *219*, 611–618.
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M.K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C.R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 2222–2231.
- Purton, J.F., Tan, J.T., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (2007). Antiviral CD4<sup>+</sup> memory T cells are IL-15 dependent. *J. Exp. Med.* *204*, 951–961.
- Qiu, C.-H., Miyake, Y., Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O., and Tanaka, M. (2009). Novel Subset of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells Localized in the Marginal Zone Is Responsible for Tolerance to Cell-Associated Antigens. *J. Immunol.* *182*, 4127–4136.
- Quezada, S.A., Simpson, T.R., Peggs, K.S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P.A., et al. (2010). Tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* *207*, 637–650.
- Rajasekar, R., Mathews, V., Lakshmi, K.M., Sellathamby, S., George, B., Viswabandya, A., Daniel, D., Chandy, M., and Srivastava, A. (2008). Plasmacytoid Dendritic Cell Count on Day 28 in HLA-Matched Related Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplant Predicts the Incidence of Acute and Chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *14*, 344–350.
- Ramanathan, S., Gagnon, J., Dubois, S., Forand-Boulerice, M., Richter, M.V., and Ilangumaran, S. (2009). Cytokine synergy in antigen-independent activation and priming of naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* *29*, 219–239.



- Ramsey, C., Rubinstein, M.P., Kim, D.M., Cho, J.-H., Sprent, J., and Surh, C.D. (2008). The lymphopenic environment of CD132 (common gamma-chain)-deficient hosts elicits rapid homeostatic proliferation of naive T cells via IL-15. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5320–5326.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* *11*, 753–761.
- Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 617–628.
- Rathmell, J.C., Farkash, E.A., Gao, W., and Thompson, C.B. (2001). IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 6869–6876.
- Rauser, G., Einsele, H., Sinzger, C., Wernet, D., Kuntz, G., Assenmacher, M., Campbell, J.D.M., and Topp, M.S. (2004). Rapid generation of combined CMV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* *103*, 3565–3572.
- Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., et al. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 336–343.
- Reddy, P., Maeda, Y., Liu, C., Krijanovski, O.I., Korngold, R., and Ferrara, J.L.M. (2005). A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat. Med.* *11*, 1244–1249.
- Reddy, P., Sun, Y., Toubai, T., Duran-Struuck, R., Clouthier, S.G., Weisiger, E., Maeda, Y., Tawara, I., Krijanovski, O., Gatz, E., et al. (2008). Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J. Clin. Invest.*
- Reddy, V., Iturraspe, J.A., Tzolas, A.C., Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J., and Wingard, J.R. (2004). Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* *103*, 4330–4335.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.
- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J., and Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* *181*, 1857–1862.
- Ringhoffer, S., Rojewski, M., Döhner, H., Bunjes, D., and Ringhoffer, M. (2013). T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/ $\beta$ TREC ratio and thymic naïve T cells. *Haematologica* *98*, 1600–1608.

- Robbins, S.H., Walzer, T., Dombé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* *9*, R17.
- Rochman, Y., and Leonard, W.J. (2008). The Role of Thymic Stromal Lymphopoietin in CD8+ T Cell Homeostasis. *J. Immunol.* *181*, 7699–7705.
- Van Rood, J.J., Eernisse, J.G., and Van Leeuwen, A. (1958). Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* *181*, 1735–1736.
- Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C., and Mathis, D. (1997). Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity* *7*, 123–134.
- Rossi, S., Blazar, B.R., Farrell, C.L., Danilenko, D.M., Lacey, D.L., Weinberg, K.I., Krenger, W., and Holländer, G.A. (2002). Keratinocyte growth factor preserves normal thymopoiesis and thymic microenvironment during experimental graft-versus-host disease. *Blood* *100*, 682–691.
- Saito, Y., Boddupalli, C.S., Borsotti, C., and Manz, M.G. (2013). Dendritic cell homeostasis is maintained by nonhematopoietic and T-cell-produced Flt3-ligand in steady state and during immune responses. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1651–1658.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118.
- Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., and Sousa, C.R. e (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* *458*, 899–903.
- Sandy, A.R., Chung, J., Toubai, T., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Blackwell, T.S., Reddy, P., King, P.D., and Maillard, I. (2013). T Cell-Specific Notch Inhibition Blocks Graft-versus-Host Disease by Inducing a Hyporesponsive Program in Alloreactive CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* *190*, 5818–5828.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Cannon, M.J., Hiserodt, J.C., Pecorelli, S., and Parham, G.P. (1999). Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology* *200*, 187–204.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., and Murphy, K.M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* *13*, 1145–1154.
- Savani, B.N., Rezvani, K., Mielke, S., Montero, A., Kurlander, R., Carter, C.S., Leitman, S., Read, E.J., Childs, R., and Barrett, A.J. (2006). Factors associated with early molecular

remission after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* *107*, 1688–1695.

Scarisbrick, J.J., Dignan, F.L., Tulpule, S., Gupta, E.D., Kolade, S., Shaw, B., Evison, F., Shah, G., Tholouli, E., Mufti, G., et al. (2015). A multicentre UK study of GVHD following DLI: Rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent. *Bone Marrow Transplant.* *50*, 62–67.

Scarselli, A., Cesare, S.D., Capponi, C., Cascioli, S., Romiti, M.L., Matteo, G.D., Simonetti, A., Palma, P., Finocchi, A., Lucarelli, B., et al. (2015). Longitudinal Evaluation of Immune Reconstitution and B-cell Function After Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 1–11.

Schlitzer, A., Loschko, J., Mair, K., Vogelmann, R., Henkel, L., Einwächter, H., Schiemann, M., Niess, J.-H., Reindl, W., and Krug, A. (2011). Identification of CCR9– murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood* *117*, 6562–6570.

Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* *1*, 426–432.

Schmid, M.A., Takizawa, H., Baumjohann, D.R., Saito, Y., and Manz, M.G. (2011). Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood* *118*, 4829–4840.

Schneidawind, D., Pierini, A., Alvarez, M., Pan, Y., Baker, J., Buechele, C., Luong, R.H., Meyer, E.H., and Negrin, R.S. (2014). CD4+ invariant natural killer T cells protect from murine GVHD lethality through expansion of donor CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* *124*, 3320–3328.

Schroeder, M.A., and DiPersio, J.F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* *4*, 318–333.

Seddon, B., and Zamoyska, R. (2002). TCR Signals Mediated by Src Family Kinases Are Essential for the Survival of Naïve T Cells. *J. Immunol.* *169*, 2997–3005.

Seggewiss, R., and Einsele, H. (2010). Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* *115*, 3861–3868.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* *209*, 653–660.

Seillet, C., Jackson, J.T., Markey, K.A., Brady, H.J.M., Hill, G.R., Macdonald, K.P.A., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2013). CD8 $\alpha$ + DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. *Blood* *121*, 1574–1583.

Servais, S., Lengline, E., Porcher, R., Carmagnat, M., Peffault de Latour, R., Robin, M., Sicre de Fontebrune, F., Clave, E., Maki, G., Granier, C., et al. (2014). Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *20*, 507–517.

Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Fry, T., Schwartzberg, P.L., Pandey, A., Mackall, C.L., and Leonard, W.J. (2004). A Role for Thymic Stromal Lymphopoietin in CD4+ T Cell Development. *J. Exp. Med.* *200*, 159–168.

Sharfe, N., Dadi, H.K., and Roifman, C.M. (1995). JAK3 protein tyrosine kinase mediates interleukin-7-induced activation of phosphatidylinositol-3' kinase. *Blood* *86*, 2077–2085.

Sharma, M., Afrin, F., Satija, N., Tripathi, R.P., and Gangenahalli, G.U. (2011). Stromal-Derived Factor-1/ *CXCR4* Signaling: Indispensable Role in Homing and Engraftment of Hematopoietic Stem Cells in Bone Marrow. *Stem Cells Dev.* *20*, 933–946.

Shaw, B.E., Arguello, R., Garcia-Sepulveda, C.A., and Madrigal, J.A. (2010). The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *150*, 251–258.

Shin, H.-J., Baker, J., Leveson-Gower, D.B., Smith, A.T., Sega, E.I., and Negrin, R.S. (2011). Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* *118*, 2342–2350.

Shlomchik, W.D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* *7*, 340–352.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells. *Science* *285*, 412–415.

Shono, Y., Ueha, S., Wang, Y., Abe, J., Kurachi, M., Matsuno, Y., Sugiyama, T., Nagasawa, T., Imamura, M., and Matsushima, K. (2010). Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *115*, 5401–5411.

Shono, Y., Shiratori, S., Kosugi-Kanaya, M., Ueha, S., Sugita, J., Shigematsu, A., Kondo, T., Hashimoto, D., Fujimoto, K., Endo, T., et al. (2014). Bone Marrow Graft-versus-Host Disease: Evaluation of Its Clinical Impact on Disrupted Hematopoiesis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 495–500.

Sili, U., Leen, A.M., Vera, J.F., Gee, A.P., Huls, H., Heslop, H.E., Bollard, C.M., and Rooney, C.M. (2012). Production of good manufacturing practice-grade cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein–Barr virus, cytomegalovirus and adenovirus to prevent or treat viral infections post-allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Cytotherapy* *14*, 7–11.

- Singh, N.J., Bando, J.K., and Schwartz, R.H. (2012). Subsets of Nonclonal Neighboring CD4<sup>+</sup> T Cells Specifically Regulate the Frequency of Individual Antigen-Reactive T Cells. *Immunity* 37, 735–746.
- Sinha, M.L., Fry, T.J., Fowler, D.H., Miller, G., and Mackall, C.L. (2002). Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 100, 2642–2649.
- Sioud, M., and Fløisand, Y. (2007). TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34<sup>+</sup> progenitors into CD11c<sup>+</sup> CD80/86<sup>+</sup> DC capable of inducing a Th1-type response. *Eur. J. Immunol.* 37, 2834–2846.
- Sioud, M., Fløisand, Y., Forfang, L., and Lund-Johansen, F. (2006). Signaling through Toll-like Receptor 7/8 Induces the Differentiation of Human Bone Marrow CD34<sup>+</sup> Progenitor Cells along the Myeloid Lineage. *J. Mol. Biol.* 364, 945–954.
- Socié, G., and Blazar, B.R. (2009). Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood* 114, 4327–4336.
- Socié, G., and Ritz, J. (2014). Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 124, 374–384.
- Soiffer, R.J., Murray, C., Cochran, K., Cameron, C., Wang, E., Schow, P.W., Daley, J.F., and Ritz, J. (1992). Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2 after autologous and T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 79, 517–526.
- Soiffer, R.J., Murray, C., Gonin, R., and Ritz, J. (1994). Effect of low-dose interleukin-2 on disease relapse after T-cell- depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 84, 964–971.
- Song, J., Ito, T., Matsuda, C., Miao, G., Tanemura, M., Nishida, T., Nozawa, M., Matsuda, H., and Sawa, Y. (2006). Inhibition of donor-derived T cells trafficking into target organs by FTY720 during acute graft-versus-host disease in small bowel transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 146, 85–92.
- Sousa, C.R. e, Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819–1829.
- Spierings, E., Kim, Y.-H., Hendriks, M., Borst, E., Sergeant, R., Canossi, A., Oudshoorn, M., Loiseau, P., Dolstra, H., Markiewicz, M., et al. (2013). Multicenter Analyses Demonstrate Significant Clinical Effects of Minor Histocompatibility Antigens on GvHD and GvL after HLA-Matched Related and Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 19, 1244–1253.

- Sprent, J., and Surh, C.D. (2011). Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol* *12*, 478–484.
- Sprent, J., and Tough, D.F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* *265*, 1395–1400.
- Sprent, J., Schaefer, M., Lo, D., and Korngold, R. (1986). Properties of purified T cell subsets. II. In vivo responses to class I vs. class II H-2 differences. *J. Exp. Med.* *163*, 998–1011.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 139–176.
- Stephen, T.L., Tikhonova, A., Riberdy, J.M., and Laufer, T.M. (2009). The activation threshold of CD4<sup>+</sup> T cells is defined by TCR/peptide-MHC class II interactions in the thymic medulla. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 5554–5562.
- Storb, R., Epstein, R.B., Rudolph, R.H., and Thomas, E.D. (1969). Allogeneic canine bone marrow transplantation following cyclophosphamide. *Transplantation* *7*, 378–386.
- Storek, J., Gooley, T., Witherspoon, R.P., Sullivan, K.M., and Storb, R. (1997). Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am. J. Hematol.* *54*, 131–138.
- Storek, J., Dawson, M.A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D.G., Marr, K.A., Witherspoon, R.P., Bensinger, W., Flowers, M.E.D., Martin, P., et al. (2001a). Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* *97*, 3380–3389.
- Storek, J., Wells, D., Dawson, M.A., Storer, B., and Maloney, D.G. (2001b). Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* *98*, 489–491.
- Storek, J., Joseph, A., Espino, G., Dawson, M.A., Douek, D.C., Sullivan, K.M., Flowers, M.E.D., Martin, P., Mathioudakis, G., Nash, R.A., et al. (2001c). Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* *98*, 3505–3512.
- Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J., and Roosnek, E. (2008). Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin. Immunopathol.* *30*, 425–437.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* *25*, 977–988.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2000). Homeostatic T Cell Proliferation How Far Can T Cells Be Activated to Self-Ligands? *J. Exp. Med.* *192*, F9–F14.

- Surh, C.D., and Sprent, J. (2008). Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* *29*, 848–862.
- Sutherland, J.S., Spyroglou, L., Muirhead, J.L., Heng, T.S., Prieto-Hinojosa, A., Prince, H.M., Chidgey, A.P., Schwarzer, A.P., and Boyd, R.L. (2008). Enhanced Immune System Regeneration in Humans Following Allogeneic or Autologous Hemopoietic Stem Cell Transplantation by Temporary Sex Steroid Blockade. *Clin. Cancer Res.* *14*, 1138–1149.
- Suzuki, H., Kündig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., and Griesser, H. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* *268*, 1472–1476.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., et al. (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8981–8986.
- Švajger, U., and Rožman, P. (2014). Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 53–69.
- Swain, S.L., Hu, H., and Huston, G. (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* *286*, 1381–1383.
- Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R.D., and Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J. Exp. Med.* *208*, 2367–2374.
- Takada, K., and Jameson, S.C. (2009a). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* *9*, 823–832.
- Takada, K., and Jameson, S.C. (2009b). Self-class I MHC molecules support survival of naive CD8 T cells, but depress their functional sensitivity through regulation of CD8 expression levels. *J. Exp. Med.* *206*, 2253–2269.
- Takebayashi, M., Amakawa, R., Tajima, K., Miyaji, M., Nakamura, K., Ito, T., Matsumoto, N., Miyazaki, Y., Zen, K., Kishimoto, Y., et al. (2004). Blood dendritic cells are decreased in acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* *33*, 989–996.
- Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* *5*, 217–228.
- Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C., Rabian, C., Garderet, L., Busson, M., Garnier, F., Douek, D., Gluckman, E., Charron, D., et al. (2002). A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood* *99*, 1458–1464.

Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8732–8737.

Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype CD8<sup>+</sup> Cells but Are Not Required for Memory Phenotype CD4<sup>+</sup> Cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1523–1532.

Tanchot, C., Lemonnier, F.A., Pérarnau, B., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* *276*, 2057–2062.

Tanel, A., Fonseca, S.G., Yassine-Diab, B., Bordi, R., Zeidan, J., Shi, Y., Benne, C., and Sékaly, R.-P. (2009). Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev. Vaccines* *8*, 299–312.

Tarakhovsky, A., Kanner, S.B., Hombach, J., Ledbetter, J.A., Müller, W., Killeen, N., and Rajewsky, K. (1995). A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* *269*, 535–537.

Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., Noelle, R.J., Rudensky, A.Y., Mak, T.W., Serody, J.S., and Blazar, B.R. (2005). Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM). *Blood* *105*, 3372–3380.

Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L.M. (2002a). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* *8*, 575–581.

Teshima, T., Reddy, P., Lowler, K.P., KuKuruga, M.A., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L.M. (2002b). Flt3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8<sup>α+</sup> dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* *99*, 1825–1832.

Thiant, S., Yakoub-Agha, I., Magro, L., Trauet, J., Coiteux, V., Jouet, J.-P., Dessaint, J.-P., and Labalette, M. (2010). Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transpl.* *45*, 1546–1552.

Thomas, E.D. (1999). A history of haemopoietic cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *105*, 330–339.

Thomas, E.D., and Blume, K.G. (1999). Historical markers in the development of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *5*, 341–346.

Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr, Lu, W.C., and Ferrebee, J.W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* *257*, 491–496.



- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr, Cannon, J.H., Sahler, O.D., and Ferrebee, J.W. (1959). Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* *38*, 1709–1716.
- Thomas, E.D., Buckner, C.D., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Sale, G.E., Sanders, J.E., Singer, J.W., Shulman, H., et al. (1979). Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med.* *301*, 597–599.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* *20*, 707–718.
- Toubai, T., Malter, C., Tawara, I., Liu, C., Nieves, E., Lowler, K.P., Sun, Y., and Reddy, P. (2010). Immunization with host-type CD8 $\alpha$ + dendritic cells reduces experimental acute GVHD in an IL-10-dependent manner. *Blood* *115*, 724–735.
- Toubai, T., Tawara, I., Sun, Y., Liu, C., Nieves, E., Evers, R., Friedman, T., Korngold, R., and Reddy, P. (2012). Induction of Acute GVHD by Sex-Mismatched H-Y Antigens in the Absence of Functional Radiosensitive Host Hematopoietic-Derived Antigen-Presenting Cells. *Blood* *119*, 3844–3853.
- Tran, I.T., Sandy, A.R., Carulli, A.J., Ebens, C., Chung, J., Shan, G.T., Radojcic, V., Friedman, A., Gridley, T., Shelton, A., et al. (2013). Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *123*, 1590–1604.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., and Weissman, I.L. (2000). Development of CD8 $\alpha$ -Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science* *290*, 2152–2154.
- Troy, A.E., and Shen, H. (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 672–676.
- Truitt, R.L., and Atasoylu, A.A. (1991). Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* *8*, 51–58.
- Tsukada, N., Akiba, H., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *95*, 2434–2439.
- Tzannou, I., and Leen, A.M. (2014). Accelerating immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* *3*, e11.
- Uphoff, D.E. (1958). Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* *N 99*, 651–653.

- Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., Kappler, J., and Murrack, P. (1997). Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J. Exp. Med.* *186*, 325–330.
- Villadangos, J.A., and Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J. Exp. Med.* *207*, 1131–1134.
- Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A., Jr (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* *10*, 559–568.
- Vivien, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int. Immunol.* *13*, 763–768.
- Vos, Q., Jones, L.A., and Kruisbeek, A.M. (1992). Mice deprived of exogenous antigenic stimulation develop a normal repertoire of functional T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 1204–1210.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* *159*, 565–573.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* *176*, 47–58.
- Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* *27*, 40–44.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., and Riddell, S.R. (1995). Reconstitution of Cellular Immunity against Cytomegalovirus in Recipients of Allogeneic Bone Marrow by Transfer of T-Cell Clones from the Donor. *N. Engl. J. Med.* *333*, 1038–1044.
- Wang, X., Li, H., Matte-Martone, C., Cui, W., Li, N., Tan, H.S., Roopenian, D., and Shlomchik, W.D. (2011). Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood* *118*, 6426–6437.
- Wang, Y.-C., Hu, X.-B., He, F., Feng, F., Wang, L., Li, W., Zhang, P., Li, D., Jia, Z.-S., Liang, Y.-M., et al. (2009). Lipopolysaccharide-induced Maturation of Bone Marrow-derived Dendritic Cells Is Regulated by Notch Signaling through the Up-regulation of CXCR4. *J. Biol. Chem.* *284*, 15993–16003.

- Wang, Y.-G., Kim, K.D., Wang, J., Yu, P., and Fu, Y.-X. (2005). Stimulating Lymphotoxin  $\beta$  Receptor on the Dendritic Cells Is Critical for Their Homeostasis and Expansion. *J. Immunol.* *175*, 6997–7002.
- Warren, E.H., Zhang, X.C., Li, S., Fan, W., Storer, B.E., Chien, J.W., Boeckh, M.J., Zhao, L.P., Martin, P.J., and Hansen, J.A. (2012). Effect of MHC and non-MHC donor/recipient genetic disparity on the outcome of allogeneic HCT. *Blood* *120*, 2796–2806.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* *9*, 676–683.
- Weber, M., Rudolph, B., Stein, P., Yogeve, N., Bosmann, M., Schild, H., and Radsak, M.P. (2014). Host-Derived CD8+ Dendritic Cells Protect Against Acute Graft-versus-Host Disease after Experimental Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*
- Weiden, P.L., Flournoy, N., Thomas, E.D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C.D., and Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* *300*, 1068–1073.
- Weinberg, K., Blazar, B.R., Wagner, J.E., Agura, E., Hill, B.J., Smogorzewska, M., Koup, R.A., Betts, M.R., Collins, R.H., and Douek, D.C. (2001). Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *97*, 1458–1466.
- Welner, R.S., Pelayo, R., Nagai, Y., Garrett, K.P., Wuest, T.R., Carr, D.J., Borghesi, L.A., Farrar, M.A., and Kincade, P.W. (2008). Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* *112*, 3753–3761.
- Willerford, D.M., Chen, J., Ferry, J.A., Davidson, L., Ma, A., and Alt, F.W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* *3*, 521–530.
- Witherden, D., van Oers, N., Waltzinger, C., Weiss, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2000). Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* *191*, 355–364.
- Wodnar-Filipowicz, A. (2003). Flt3 Ligand: Role in Control of Hematopoietic and Immune Functions of the Bone Marrow. *Physiology* *18*, 247–251.
- Wofford, J.A., Wieman, H.L., Jacobs, S.R., Zhao, Y., and Rathmell, J.C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* *111*, 2101–2111.
- Wolf, D., Lilienfeld-Toal, M. von, Wolf, A.M., Schleuning, M., Bergwelt-Baildon, M. von, Held, S.A.E., and Brossart, P. (2012). Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. *Blood* *119*, 16–25.

- Wong, P., Barton, G.M., Forbush, K.A., and Rudensky, A.Y. (2001). Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J. Exp. Med.* *193*, 1179–1187.
- Workman, C.J., and Vignali, D.A.A. (2005). Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *J. Immunol.* *174*, 688–695.
- Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 304–312.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* *9*, 839–847.
- Wu, Q., Wang, Y., Wang, J., Hedgeman, E.O., Browning, J.L., and Fu, Y.-X. (1999). The Requirement of Membrane Lymphotoxin for the Presence of Dendritic Cells in Lymphoid Tissues. *J. Exp. Med.* *190*, 629–638.
- Wu, T., Young, J.S., Johnston, H., Ni, X., Deng, R., Racine, J., Wang, M., Wang, A., Todorov, I., Wang, J., et al. (2013). Thymic Damage, Impaired Negative Selection, and Development of Chronic Graft-versus-Host Disease Caused by Donor CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.*
- Xhaard, A., Moins-Teisserenc, H., Busson, M., Robin, M., Ribaud, P., Dhedin, N., Abbes, S., Carmagnat, M., Kheav, V.-D., Maki, G., et al. (2014). Reconstitution of regulatory T-cell subsets after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* *49*, 1089–1092.
- Xie, Y., Akpınarli, A., Maris, C., Hipkiss, E.L., Lane, M., Kwon, E.-K.M., Muranski, P., Restifo, N.P., and Antony, P.A. (2010). Naive tumor-specific CD4+ T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J. Exp. Med.* *207*, 651–667.
- Xun, C.Q., Thompson, J.S., Jennings, C.D., Brown, S.A., and Widmer, M.B. (1994). Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* *83*, 2360–2367.
- Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, G.F., Fiorese, C., Bonito, A.J., Inaba, K., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2008). CD8+CD205+ Splenic Dendritic Cells Are Specialized to Induce Foxp3+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *181*, 6923–6933.
- Yáñez, A., Goodridge, H.S., Gozalbo, D., and Gil, M.L. (2013). TLRs control hematopoiesis during infection. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2526–2533.
- Yang, J., Huck, S.P., McHugh, R.S., Hermans, I.F., and Ronchese, F. (2006). Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 147–152.

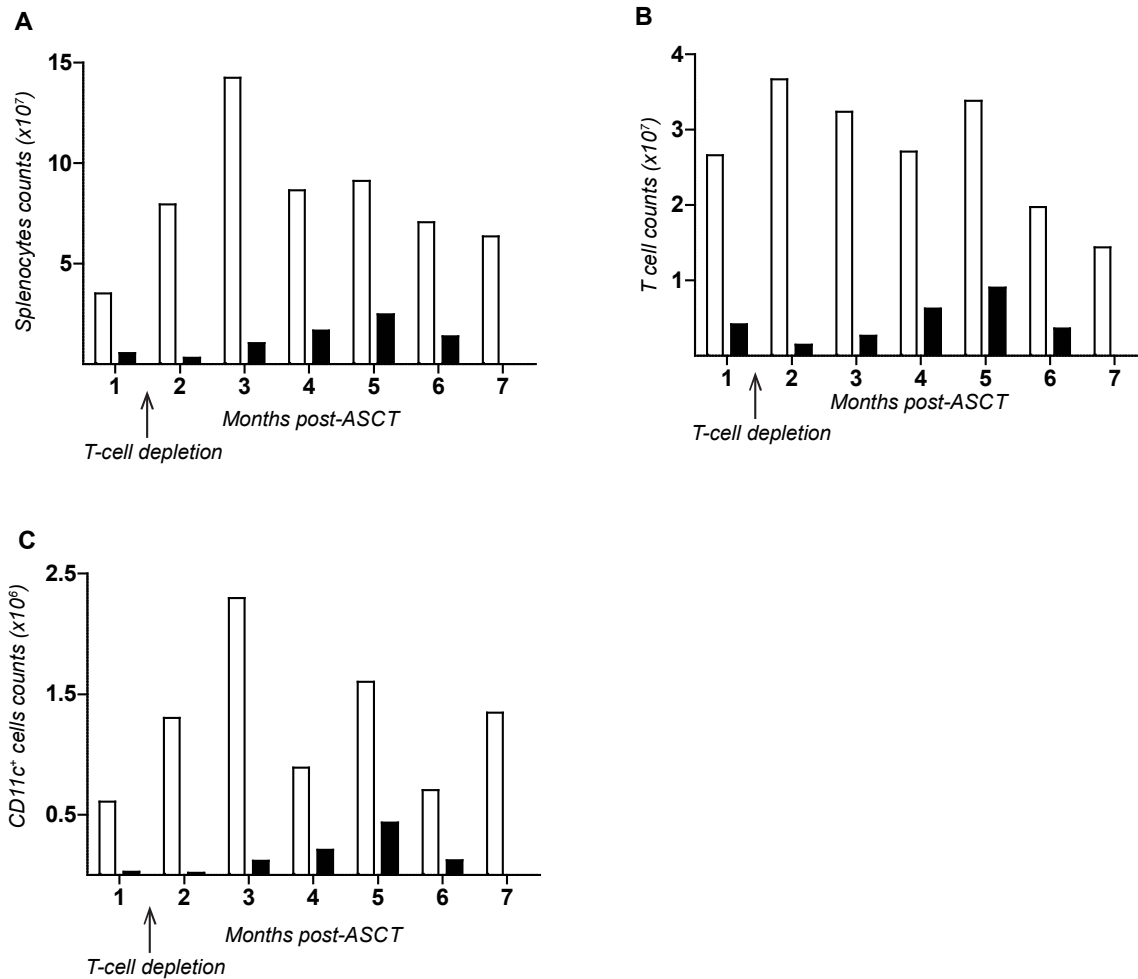
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., et al. (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* *205*, 2827–2838.
- Yao, Y., Song, X., Cheng, H., Tang, G., Hu, X., Zhou, H., and Wang, J. (2014). Dysfunction of bone marrow vascular niche in acute graft-versus-host disease after MHC-haploidentical bone marrow transplantation. *PloS One* *9*, e104607.
- Yao, Z., Cui, Y., Watford, W.T., Bream, J.H., Yamaoka, K., Hissong, B.D., Li, D., Durum, S.K., Jiang, Q., Bhandoola, A., et al. (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1000–1005.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J.F., Bannenberg, G.L., Serhan, C.N., Hayden, M.S., Hieny, S., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. *Science* *308*, 1626–1629.
- Yates, J., Rovis, F., Mitchell, P., Afzali, B., Tsang, J.-S., Garin, M., Lechler, R.I., Lombardi, G., and Garden, O.A. (2007). The maintenance of human CD4+CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int. Immunol.* *19*, 785–799.
- Yu, X.Z., Bidwell, S.J., Martin, P.J., and Anasetti, C. (2000). CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4564–4568.
- Yu, X.-Z., Albert, M.H., and Anasetti, C. (2006). Alloantigen affinity and CD4 help determine severity of graft-versus-host disease mediated by CD8 donor T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 3383–3390.
- Zaft, T., Sapozhnikov, A., Krauthgamer, R., Littman, D.R., and Jung, S. (2005). CD11c<sup>high</sup> Dendritic Cell Ablation Impairs Lymphopenia-Driven Proliferation of Naive and Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* *175*, 6428–6435.
- Zanetti, M. (2015). Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. *J. Immunol.* *194*, 2049–2056.
- Zecher, D., Li, Q., Oberbarnscheidt, M.H., Demetris, A.J., Shlomchik, W.D., Rothstein, D.M., and Lakkis, F.G. (2010). NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 6649–6657.
- Zhang, C., Todorov, I., Zhang, Z., Liu, Y., Kandeel, F., Forman, S., Strober, S., and Zeng, D. (2006). Donor CD4<sup>+</sup> T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* *107*, 2993–3001.

- Zhang, P., Wu, J., Deoliveira, D., Chao, N.J., and Chen, B.J. (2012). Allospecific CD4+ Effector Memory T Cells Do Not Induce Graft-versus-Host Disease in Mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *18*, 1488–1499.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* *8*, 591–599.
- Zhang, Y., Hexner, E., Frank, D., and Emerson, S.G. (2007). CD4+ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 3305–3314.
- Zhang, Y., Sandy, A.R., Wang, J., Radojcic, V., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Kato, K., He, S., Cui, S., et al. (2011). Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4+ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* *117*, 299–308.
- Zheng, H., Matte-Martone, C., Li, H., Anderson, B.E., Venketesan, S., Tan, H.S., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2008). Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood* *111*, 2476–2484.
- Zheng, H., Matte-Martone, C., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2009). Central Memory CD8+ T Cells Induce Graft-versus-Host Disease and Mediate Graft-versus-Leukemia. *J. Immunol.* *182*, 5938–5948.
- Ziegler, S.F., and Liu, Y.-J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol.* *7*, 709–714.
- Ziegler, S.E., Morella, K.K., Anderson, D., Kumaki, N., Leonard, W.J., Cosman, D., and Baumann, H. (1995). Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction. *Eur. J. Immunol.* *25*, 399–404.

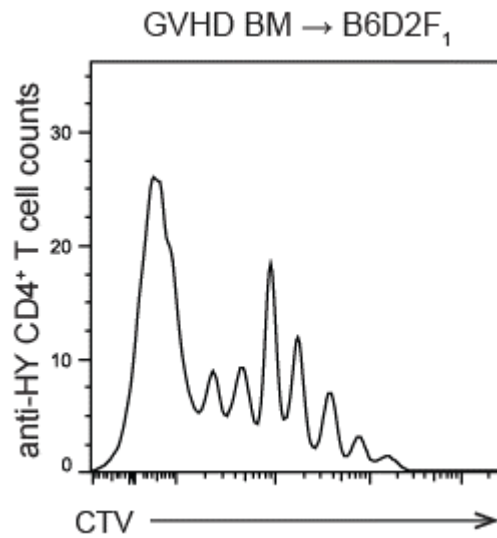


# Annexes

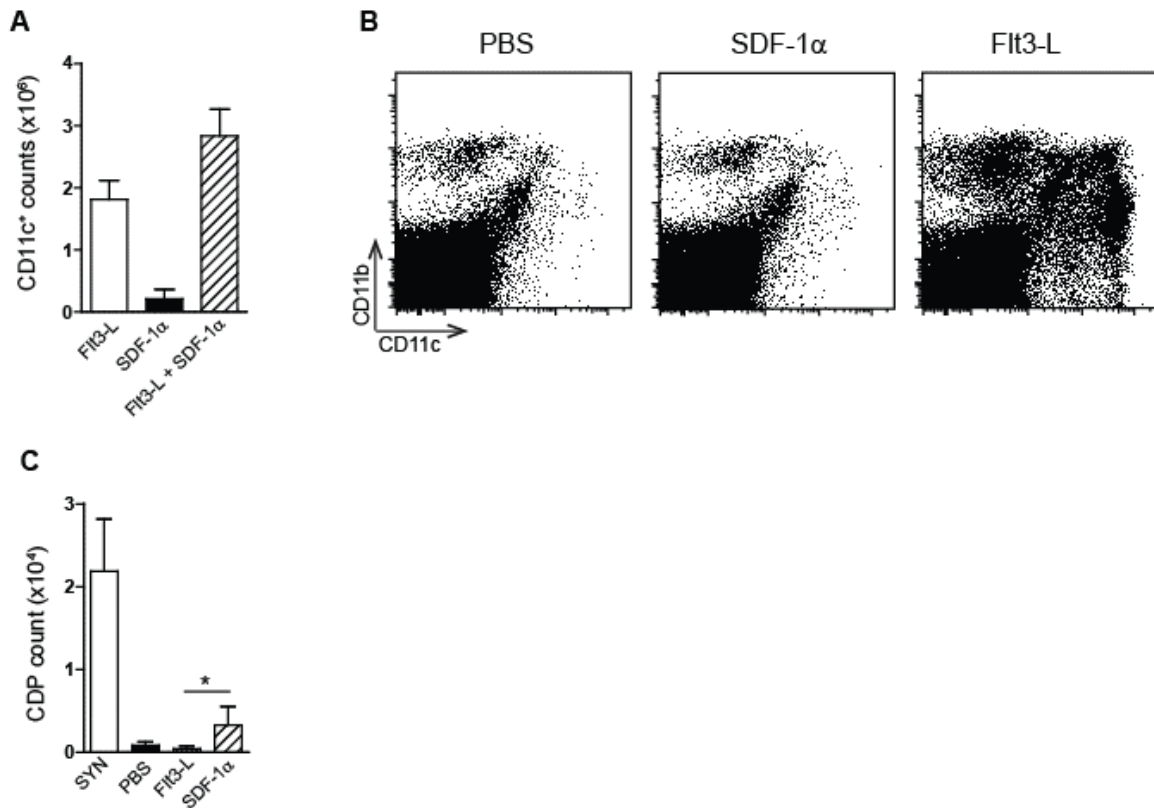




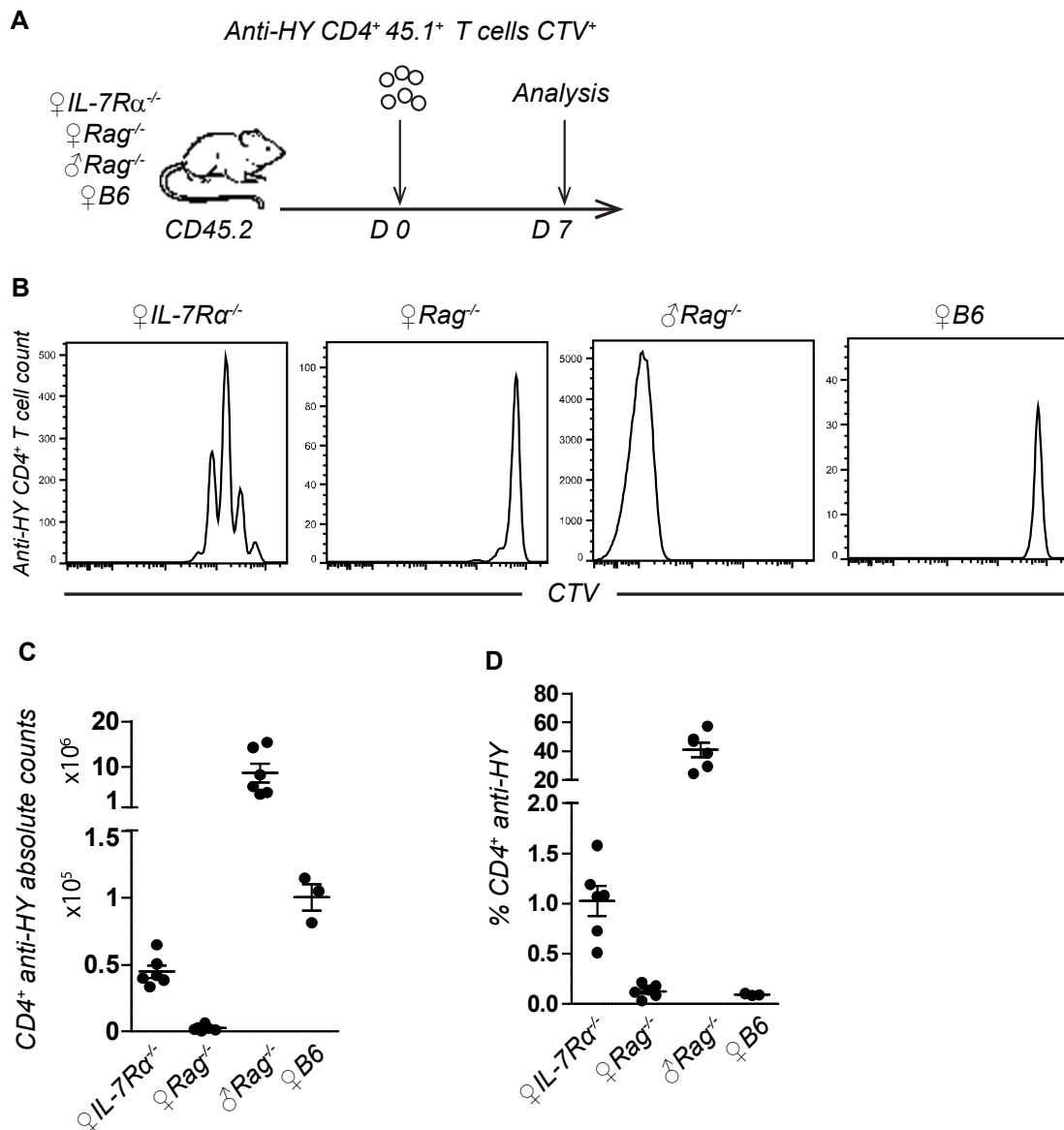
**Figure 1. Reconstitution des cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> dans les mois après l'élimination des LT alloreactifs.** Des souris B6D2F<sub>1</sub> ont été greffées avec  $1 \times 10^7$  cellules de MO de souris B6 combiné à  $1 \times 10^6$  de LT purifiés provenant d'une souris B6D2F<sub>1</sub> (groupe contrôle, en blanc) ou  $1 \times 10^6$  de LT purifiés provenant de souris B6.SJL (groupe GVHD, en noir). Les souris ont par la suite reçu deux traitements d'anti-CD4 (GK1.5, 500 $\mu$ g/souris) et d'anti-CD8 (2.83, 500 $\mu$ g/souris) aux jours +28 et +30 post-greffe. Le nombre de splénocytes, de LT et de DC a été mesuré dans la rate des souris à chaque mois par FACS. **(A)** Nombre de splénocytes retrouvés dans la rate des souris greffées. **(B)** Nombre de LT retrouvés dans la rate des souris greffées. **(C)** Nombre de cellules CD11c<sup>+</sup> retrouvées dans la rate des souris greffées. Représentatif d'une expérience, 1 souris/groupe.



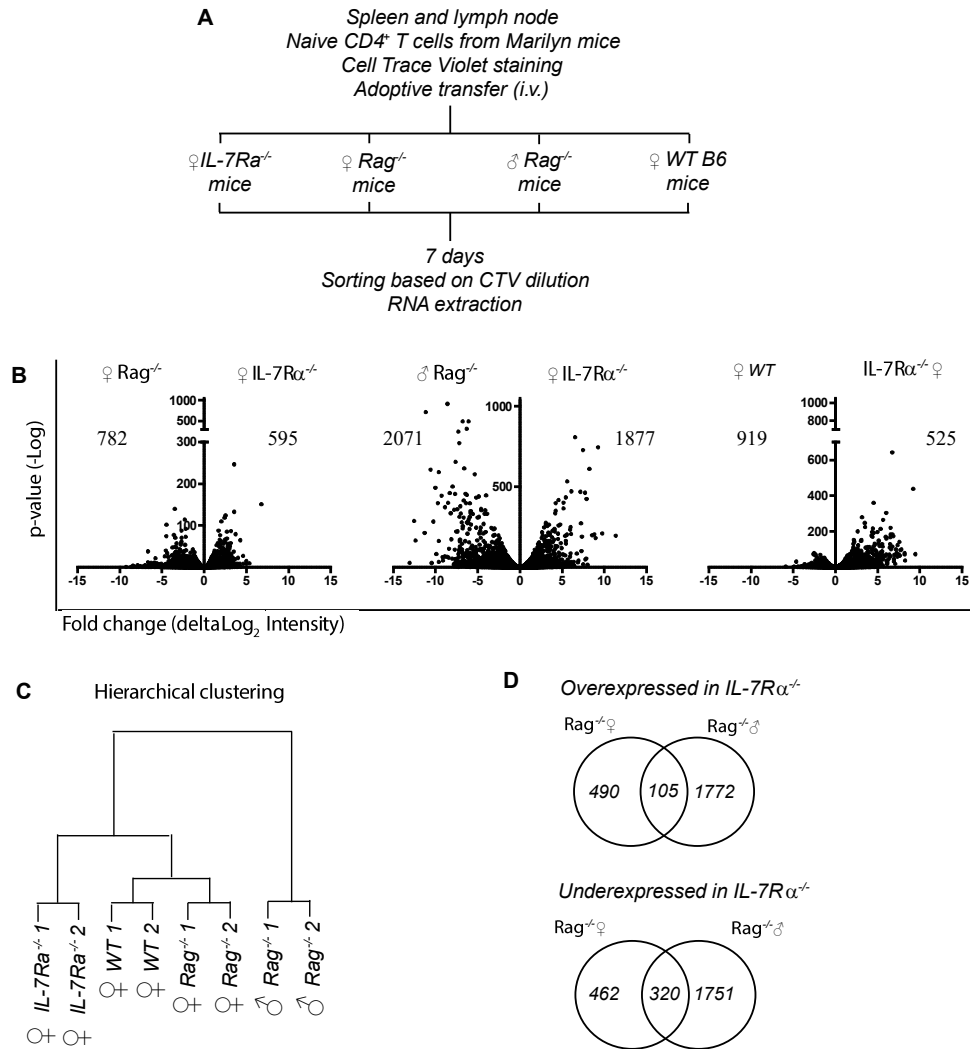
**Figure 2. Prolifération homéostatique des LT CD4<sup>+</sup> anti-HY transférés dans des receveuses secondaires de MO de souris en GVHD.** 10x10<sup>6</sup> cellules de MO ont été isolés à j +35 de souris IL-7Rα<sup>-/-</sup> → B6D2F<sub>1</sub> en GVHD et transplantées dans des souris receveuses secondaires B6D2F<sub>1</sub>. Deux mois après la transplantation, des LT CD4<sup>+</sup> anti-HY marqués au CTV ont été transférés. Leur prolifération homéostatique a été analysée 7 jours plus tard par FACS. Représentatif de 1 expérience, 3 souris.



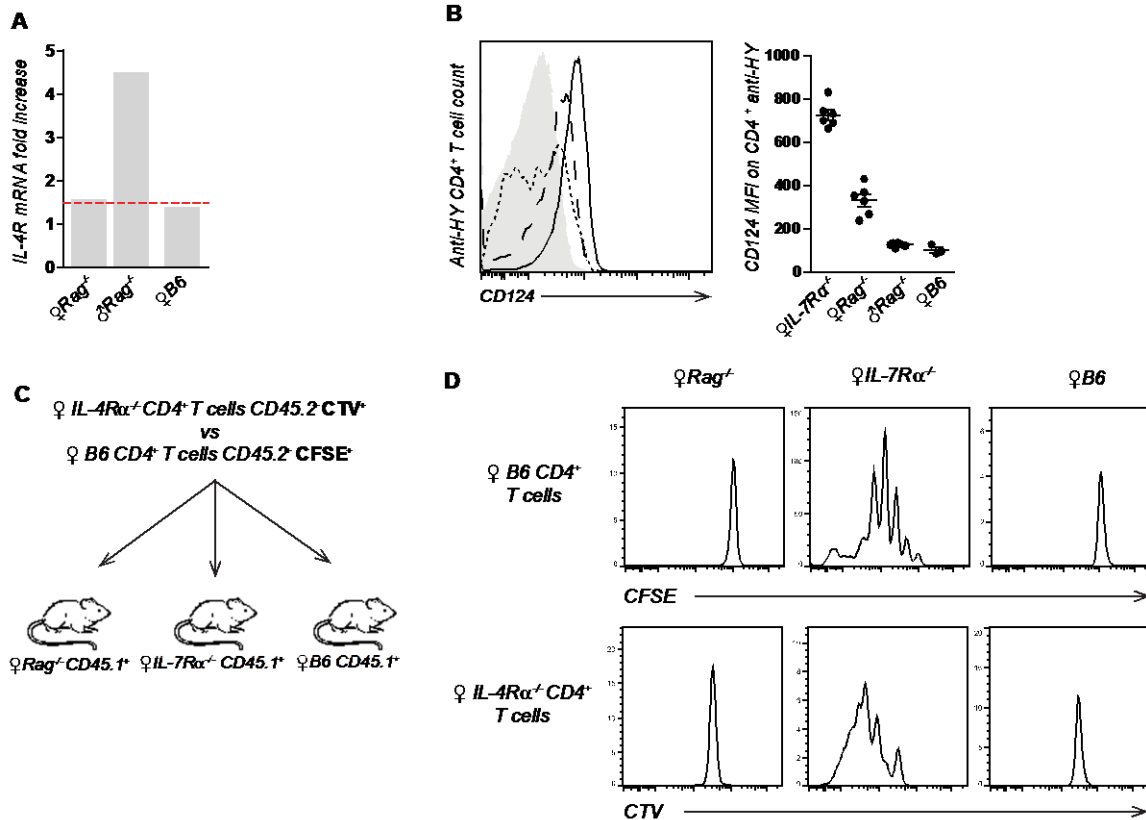
**Figure 3. Le SDF-1 $\alpha$  ne peut pas g nerer des cellules dendritiques.** (A)  $6 \times 10^6$  de cellules de MO de souris B6 ont été cultiv es *in vitro* pendant 7 jours avec du Flt3-L, du SDF-1 $\alpha$  ou les deux ensemble. (B) Des souris Flt3-L<sup>-/-</sup> ont été traitées au PBS, SDF-1 $\alpha$  ou Flt3-L pendant 10 jours puis le nombre de DC dans la rate a été analysé par FACS (C) Nombre de CDP dans la MO des souris contrôles ou en GVHD traitées au Flt3-L ou au SDF-1 $\alpha$  pendant 14 jours.



**Figure 4. Prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs anti-HY.** (A)  $1 \times 10^6$  LT CD4<sup>+</sup> naïfs anti-HY ont été isolés et marqués au CTV avant d'être transférés dans des souris femelles IL-7R $\alpha^{-/-}$ , Rag $^{-/-}$ , B6 et des souris mâles Rag $^{-/-}$ . La prolifération des cellules a été analysée par FACS 7 jours après transfert. (B) Histogrammes représentatifs du profil de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> anti-HY transférés dans les différents receveurs mentionnés en (A). (C) Compte absolu des LT CD4<sup>+</sup> anti-HY retrouvés dans les receveurs 7 jours post-transfert. (D) Pourcentage du nombre de LT CD4<sup>+</sup> anti-HY retrouvés dans les receveurs 7 jours post-transfert. Représentatif de 2 expériences, 3 souris/groupe, sauf souris B6 représentant juste 1 expérience.



**Figure 5. Séquençage à ARN des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs.** (A)  $1 \times 10^6$  LT CD4<sup>+</sup> naïfs anti-HY ont été isolés et marqués au CTV avant d'être transférés dans des souris femelles IL-7Rα<sup>-/-</sup>, Rag<sup>-/-</sup>, B6 et des souris mâles Rag<sup>-/-</sup>. Sept jours après transfert, les LT ont été triés par FACS directement dans du TRIzol puis envoyés pour séquençage d'ARNm. (B) Volcano plots représentant les gènes différentiellement exprimés dans les LT transférés entre la condition de prolifération homéostatique (receveur IL-7Rα<sup>-/-</sup>) et les autres conditions (différence 1.5X,  $p \leq 0.05$ ). (C) Arbre hiérarchique basé sur le profil d'expression génique des LT transférés dans les différents receveurs. Représentatif de 2 expériences, 4 souris/groupe. (D) Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés dans les LT en PH comparé aux LT transférés dans les souris femelles Rag<sup>-/-</sup> ou mâles Rag<sup>-/-</sup>.



**Figure 6. Expression de l'IL-4R et transfert des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs IL-4Rα<sup>-/-</sup>.** (A) Expression de l'ARNm de l'IL-4Rα dans les LT en PH comparé aux autres groupes. La ligne rouge représente 1.5X. (B) Histogramme représentatif de l'expression de l'IL-4R à la surface des LT CD4<sup>+</sup> naïfs transférés dans les différents groupes. Représentatif de 2 expériences, 3 souris/groupe. (C) 1x10<sup>6</sup> LT IL-4Rα<sup>-/-</sup> marqués au CTV et 1x10<sup>6</sup> LT B6 marqués au CFSE ont été transférés dans des souris receveuses femelles Rag<sup>-/-</sup> CD45.1<sup>+</sup>, IL-7Rα<sup>-/-</sup> CD45.1<sup>+</sup> et B6 CD45.1<sup>+</sup>. La PH des LT a été analysée par FACS 7 jours après transfert. (D) Histogramme représentatif du profil de prolifération homéostatique des LT transférés dans les différents groupes mentionnés en (C). Représentatif d'une expérience, 3 souris/groupe.

**Tableau I. Voies de signalisation surreprésentées par les gènes différentiellement exprimés spécifiques à la PH des LT CD4<sup>+</sup> naïfs.**

<b>KEGG pathways represented according to specific transcript expression</b>	
<i>Over expressed in HP</i>	<i>P-value</i>
Jak-STAT signaling pathway	2.586E-6
Steroid biosynthesis	1.333E-4
Hematopoietic cell lineage	0.001
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.015
Cell cycle	0.042
Type I diabetes mellitus	0.055
 <i>Lower expressed in HP</i>	
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.047
Complement and coagulation cascades	0.064
Chemokine signaling pathway	0.074

**Tableau II. Régulateurs potentiels en amont des gènes différentiellement exprimés spécifiques à la PH des LT CD4<sup>+</sup> naïfs.**

<b>Upstream regulator of gene sets modulated in HP (IL-7Ra<sup>-/-</sup>) vs no HP (Rag<sup>-/-</sup>F)</b>			
<i>Upstream Regulator</i>	<i>Molecule Type</i>	<i>Activation z-score</i>	<i>p-value of overlap</i>
PTGER2	G-protein coupled receptor	4,629	2,32E-28
IL5	cytokine	3,414	4,73E-07
CD38	enzyme	3,414	1,11E-07
STAT5A	transcription regulator	2,891	2,03E-10
STAT5B	transcription regulator	2,720	4,27E-04
Esrra	transcription regulator	2,449	8,54E-02
HSF1	transcription regulator	2,345	7,77E-05
LCN2	transporter	2,235	1,51E-06
APOE	transporter	2,000	2,58E-06
COPS8	other	2,000	2,14E-03
MYB	transcription regulator	1,982	3,61E-03
IL4	cytokine	1,873	4,21E-16
TRAF3	other	1,792	6,33E-06
IL13	cytokine	1,588	5,25E-06



