

Université de Montréal

**Mécanismes d'action des cellules stromales  
mésenchymateuses dans le traitement de la réaction du  
greffon contre l'hôte**

par

William Lemieux

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Décembre 2015

© William Lemieux, 2015

## Résumé

La maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) est un effet secondaire sérieux de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT). Cette maladie entraîne une haute mortalité et ses symptômes sont dévastateurs. Les traitements actuels de la GvHD comportent plusieurs produits, tels les corticostéroïdes, mais ces derniers sont immunosuppresseurs et leurs effets secondaires sont aussi très dommageables pour les patients et leur guérison. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) représentent une alternative ou une addition potentielle de traitement pour la GvHD et ces cellules ne semblent pas posséder les effets secondaires des traitements classiques. Un nombre important d'études cliniques faisant l'objet des MSC ont été enregistrées. Malgré cet engouement, le mécanisme de leur immunomodulation reste encore à élucider. Notre objectif est donc de mieux définir ce mécanisme. Nous avons utilisé un modèle simplifié pour simuler la GvHD *in vitro*. Ce modèle se base sur la stimulation de lymphocytes CD4<sup>+</sup> par des cellules dendritiques allogéniques. La mesure de la prolifération de ces cellules stimulées sert d'indicateur de leur réactivité. Selon les résultats obtenus par la technologie CRISPR de génie génétique, les MSC exerceraient leur immunosuppression sur les cellules T CD4<sup>+</sup> principalement par la sécrétion de l'enzyme IDO1. Les MSC seraient également capables d'induire certaines cellules CD4<sup>+</sup> en cellules régulatrices, un processus indépendant de la sécrétion d'IDO1. Toutefois, ces cellules ne semblent pas correspondre aux cellules Treg conventionnelles.

**Mots-clés :** MSC, GvHD, cellules T CD4<sup>+</sup>, HSCT, IDO1, CRISPR

## **Abstract**

Graft versus host disease (GvHD) is a very serious side effect of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This disease results in high mortality and devastating symptoms. Treatments for GvHD include a lot of pharmaceuticals, including corticosteroids, but these are immunosuppressive and their adverse effects cause a lot of damage to the patient and hinder the healing process. Mesenchymal stromal cells (MSC) represent a potential alternative or addition to the GvHD treatment regimen. These cells do not seem to carry the secondary effects associated with classical treatments. A number of studies have been registered concerning MSC. In spite of the spike of interest, the mechanism of immunomodulation deployed by MSC remains to be elucidated. Our objective is to better characterise this mechanism. We have used a simple *in vitro* model to simulate GvHD. This model is based on the stimulation of CD4<sup>+</sup> T cells by allogenic dendritic cells. The measure of the proliferation of the stimulated lymphocytes serves as an indicator of the reactivity. According to the results obtained by CRISPR genetic engineering, MSC exert this immunomodulatory effect on T cells mainly by the secretion of IDO1 enzyme. These MSC are also able to induce T cells to become inhibitory, a process independent of the secretion of IDO1. However, these inhibitory T cells would not correspond to conventional Treg cells.

**Keywords** : MSC, GvHD, CD4<sup>+</sup> T cells, HSCT, IDO1, CRISPR

## Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des sigles .....	viii
Remerciements.....	xi
1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Le projet.....	1
1.2 La GvHD.....	1
1.2.1 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	1
1.2.2 Manifestations et prévalence.....	2
1.2.3 Pathophysiologie.....	4
1.2.4 Les facteurs de risque.....	7
1.2.5 Les traitements actuels.....	11
1.3 Les cellules stromales mésenchymateuses.....	16
1.3.1 Tissus d'origine.....	16
1.3.2 Hétérogénéité .....	17
1.3.3 Utilisations cliniques potentielles .....	18
1.3.4 Mécanisme d'immunomodulation .....	19
1.4 CRISPR.....	23
1.4.1 Origine du système CRISPR.....	23
1.4.2 Adaptation du système CRISPR pour le génie génétique.....	24
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	26
2.1 Réactifs et milieux .....	26
2.2 Cellules stromales mésenchymateuses .....	27
2.3 Vecteurs lentiviraux .....	27

2.4	Production virale.....	28
2.5	Modification génétique des MSC .....	28
2.6	Mesure des dérivés kynuréniques.....	29
2.7	Western blotting.....	30
2.8	Obtention des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	31
2.9	Marquage des lymphocytes.....	31
2.10	Préparation des cellules dendritiques matures .....	32
2.11	Réaction leucocytaire mixte (MLR) .....	32
2.12	Transfert de cellules CD4 <sup>+</sup> .....	34
2.13	Statistiques .....	35
3.	RÉSULTATS.....	36
3.1	Validation du modèle.....	36
3.2	Nature soluble du médiateur .....	38
3.3	Inhibition des enzymes COX-1 et COX-2.....	39
3.4	Inhibition du lactate .....	40
3.5	Inhibition de l'enzyme IDO1 .....	40
3.6	Validation de la technique de transfert .....	44
3.7	Irradiation des cellules transférées.....	47
4.	DISCUSSION.....	49
4.1	Validation du modèle.....	49
4.2	Nature soluble du médiateur .....	51
4.3	Inhibition des enzymes COX-1 et COX-2.....	52
4.4	Inhibition du lactate .....	53
4.5	Inhibition de l'enzyme IDO1 .....	53
4.6	Validation de la technique de transfert .....	56
4.7	Irradiation des cellules transférées.....	57
5.	PERSPECTIVES .....	60
6.	CONCLUSION.....	61
	Bibliographie.....	xi

Annexe A	Stratégie de recherche des études cliniques .....	xviii
Annexe B	Solutions pour le Western Blot.....	xix
Annexe C	Formulaire de consentement.....	xxi

## Liste des tableaux

Tableau I – Stades cliniques par système d’organes.....	3
Tableau II – Gradation générale de la GvHD dite de Glucksberg.....	4
Tableau III – Gradation générale de la GvHD dite de l’IBMTR.....	4
Tableau IV - La diversité HLA.....	9

## Liste des figures

Figure 1 - Schéma de sélection des donneurs .....	10
Figure 2 – Sélections de régimes de conditionnement d'intensités variées.....	12
Figure 3 – Utilisation de la prednisone pour le traitement de la GvHD après des conditionnements myéloablatifs ou non myéloablatifs.....	13
Figure 4 – Hétérogénéité des MSC.....	17
Figure 5 – Illustration du lactate comme un joueur clé dans le cancer.....	22
Figure 6 – Schéma du transfert de cellules .....	34
Figure 7 – Stratégie d'acquisition en cytométrie en flux.....	36
Figure 8 – Validation du modèle de stimulation.....	37
Figure 9 – Indépendance du contact pour le mécanisme d'action des MSC .....	38
Figure 10 – Effet des dérivés des cyclooxygénases sur l'inhibition par les MSC.....	39
Figure 11 – Effet de l'OXA sur les propriétés des MSC .....	40
Figure 12 – Utilisation du composé 1-MT dans la MLR.....	41
Figure 13 – Suppression de l'enzyme IDO1 par ARN interférant.....	42
Figure 14 – Suppression de l'enzyme IDO1 par modification génétique.....	43
Figure 15 – Fonction des MSC IDO-/- .....	44
Figure 16 – Stratégie d'acquisition en cytométrie en flux.....	45
Figure 17 – Transfert de cellules .....	46
Figure 18 – Irradiation des cellules transférées .....	47

## Liste des sigles

1-MT : 1-méthyl tryptophane

7AAD : 7-amino actinomycine D

aGvHD : maladie aïgue du greffon contre l'hôte

ADN :acide désoxyribonucléique

AhR : récepteur aux hydrocarbones

APC : cellule présentatrice d'antigènes

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

CFSE : « CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit »

cGvHD : maladie chronique du greffon contre l'hôte

CMV : cytomégalovirus

COX : cyclooxygénase

CRISPR : « clustered regularly interspaced short palindromic repeats »

CsA : cyclosporine A

DMEM : « Dubelcco's Modified Eagle Medium »

D-PBS : « Dubelcco's Phosphate-Buffered Saline »

GvHD : maladie du greffon contre l'hôte

HDR : « homology directed repair »

HLA : antigènes leucocytaires humains

HSC : cellules souches hématopoïétiques

HSCT : transplantation de cellules souches hématopoïétiques

hTERT : télomérase humaine

ICJME : *International Commitee of Medical Journal Editors*

ICTRP : Système d'enregistrement international des essais cliniques

IDM : indométacine

IDO1 : indoleamine 2,3- dioxygénase

IFN- $\gamma$  : interféron gamma

IL : interleukine

KIR : « killer immunoglobulin-like receptor »

LDH : lactate déhydrogénase  
LDHA : lactate déhydrogénase A  
LDHB : lactate déhydrogénase B  
LPS : lipopolysaccharide  
mDC : cellule dendritique mature  
MEM : « minimal essential medium »  
MHC : complexe majeur d'histocompatibilité  
MLR : réaction leucocytaire mixte  
MMF : mycophénolate mophétyl  
MSC : cellules stromales mésenchymateuses  
MTX : méthotrexate  
MUD : donneur non-apparenté  
NaCl : chlorure de sodium  
NHEJ : « non-homologous end joining »  
NIH : *National Institutes of Health*  
NP40 : IGEPAL CA-630  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OXA : acide oxamique  
PAM : motif associé aux proto-espaceur  
PD-1 : « programmed cell death protein 1 »  
PE : phycoérythrine  
PEI : polyéthylènimine  
PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>  
RPMI : « Roswell Park Memorial Institute medium »  
SDS: sodium dodécylsulfate  
sgARN : « small guide » ARN  
TCA : acide trichloroacétique  
TCR : récepteur du lymphocyte T  
TEMED : tétraméthyléthylènediamine  
TGF- $\beta$  : « transforming growth factor »- $\beta$   
TLR : récepteur de type Toll

TNF : « tumor necrosis factor »

TSG-6 : « TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6 »

VPD450 : « Violet Proliferation Dye 450 »

WBMT : « Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation »

B-ME :  $\beta$ -mercaptoéthanol

## **Remerciements**

Je tiens à remercier le Dr Elie Haddad qui m'a permis de réaliser mes travaux de maîtrise dans son laboratoire et qui a su me diriger dans ces recherches. Je veux aussi remercier la Dr Silvia Selleri qui m'a encadré dans mes travaux et qui a su répondre à mes questions. De plus, merci à Kathie Béland et à tous les autres membres du laboratoire, qui m'ont conseillé et appuyé pendant ces deux ans. Finalement, merci à Hélène et à ma famille de m'avoir soutenu.

# **1. INTRODUCTION**

## **1.1 Le projet**

Le but du projet est d'élucider le mécanisme d'immunomodulation des cellules stromales mésenchymateuses (MSC). Cet effet est particulièrement intéressant dans le cadre de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). La GvHD est une pathologie découlant de la transplantation de cellules souches, utilisée comme traitement de plusieurs maladies acquises ou innées. Il existe actuellement plusieurs avenues de traitements contre la GvHD, mais ceux-ci ne sont pas efficaces dans tous les cas et engendrent plusieurs effets secondaires, dont le retard du développement immunitaire et l'immunosuppression. Ces effets secondaires sont particulièrement importants, puisqu'ils rendent le patient vulnérable aux infections en tous genres. Les MSC ont été proposées et testées en clinique comme un ajout aux traitements de la GvHD, mais leurs mécanismes sont encore mal élucidés. C'est pourquoi il est important de mieux comprendre leurs effets sur le système immunitaire; cela permettra d'améliorer de façon dirigée les traitements à base de MSC.

## **1.2 La GvHD**

### **1.2.1 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques**

L'utilisation de cellules souches hématopoïétiques (HSC) pour traiter certaines maladies, tels les déficits immunitaires et les hémopathies malignes, a débuté avec les travaux du Dr E. D. Thomas en 1955 (1). Malgré les complications et la mortalité précoce associées avec cette procédure au début de son introduction, on dénombre aujourd'hui plus de 50 000 transplantations par année et le cap du million de transplantations a été atteint en 2013, selon le « Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation » (WBMT).

La technique, les sources de HSC et les considérations ont évolué depuis 1959, notamment avec la découverte du système d'antigènes leucocytaires humains (HLA). La prise en compte et l'appariement des marqueurs HLA du patient et du donneur ont permis de grandement améliorer la survie des patients, en diminuant la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Cette complication représente la cause de morbidité et de mortalité la plus importante chez les patients ayant recours à la greffe de HSC (HSCT).

Lors de la transplantation de cellules souches, d'autres cellules sont présentes dans le greffon, notamment les lymphocytes T. Ces cellules sont spécialisées dans l'élimination de cellules étrangères, alors lorsque les lymphocytes T transfusés avec les cellules souches ne sont pas identiques au receveur au niveau de leur HLA principalement, et possiblement au niveau d'autres antigènes encore mal étudiés, elles attaquent les cellules de l'hôte (2). Cette réaction immunitaire dirigée par les cellules du greffon détruit les cellules de plusieurs organes cibles sensibles du patient ; elle est nommée GvHD.

Les HSC peuvent provenir de plusieurs sources : de la moelle osseuse, du sang périphérique après la mobilisation et du sang de cordon ombilical. Ces trois sources de cellules souches sont utilisées pour la greffe, bien qu'elles n'aient pas exactement les mêmes propriétés. Les différences dans l'incidence de GvHD selon les sources de cellules souches ont été éliminées avec les conditions de transplantation récentes (3).

### **1.2.2 Manifestations et prévalence**

La GvHD représente la limitation clinique principale de la HSCT. En effet, jusqu'à 60% des patients transplantés subiront une GvHD aiguë (aGvHD) (4). Cette réaction a lieu tôt suite à la transplantation, typiquement avant le centième jour post-transplantation. Elle se manifeste au niveau de la peau, du tractus digestif et du foie (5). Pour chacun de ces tissus, un stade de 1 à 4 est donné pour caractériser la gravité de l'atteinte (Tableau I); ces critères sont dits objectifs puisqu'ils ne sont pas sujet à l'interprétation du clinicien. Le dernier critère, la performance clinique, est dite subjective et peut amener des différences d'interprétation entre les évaluateurs; elle représente la capacité générale du patient. Les stades sont ensuite compilés pour établir le grade, qui est un indicateur pronostic et sert à la gestion de la maladie (6). L'échelle de Glucksberg (Tableau II) se base sur tous les critères objectifs et subjectifs (6, 7). L'utilisation d'un critère subjectif et l'hétérogénéité dans la progression de la maladie de patients classés dans le même stade a amené la création d'une seconde échelle de classification (Tableau III), l'échelle de l'IBMTR (8).

De plus, chez environ un tiers des patients, la réaction sera caractérisée comme sévère (d'un stade III à IV ou C à D selon les échelles de Glucksberg et de l'IBMTR respectivement), c'est-à-dire que la peau et les organes entériques sont plus gravement atteints (4, 7). Entre 30 et

60% des patients résistent aux corticostéroïdes, qui sont utilisés comme thérapie de première ligne (9). Après la thérapie de première ligne, d'autres traitements doivent être utilisés, mais la mortalité reste élevée (70%) malgré les traitements dans les formes sévères (9).

La GvHD chronique (cGvHD) se présente normalement par définition après le centième jour suivant la transplantation. Comme dans l'aGvHD, la peau et le tractus digestif peuvent être atteints, mais d'autres organes peuvent aussi être atteints, tels que les yeux, les poumons, les organes reproducteurs féminins et les articulations. Environ 10 à 70% des patients développeront ce type de GvHD dépendamment des conditions de transplantation et deux patients sur trois ne répondront pas aux corticostéroïdes qui représentent la thérapie de première ligne (10, 11).

**Tableau I – Stades cliniques par système d'organes**

<i>Stade</i>	<i>Peau</i>	<i>Foie</i>	<i>Tractus intestinal</i>	<i>Performance clinique</i>
1	Éruption maculopapulaire; < 25% BSA	Billirubine sanguine 34 -50 $\mu$ M	Diarrhée > 0.5 L/jour	Activités normales
2	Éruption maculopapulaire; 25-50% BSA	Billirubine sanguine 51 - 102 $\mu$ M	Diarrhée > 1 L/jour	Activités intenses restreintes
3	Éruption maculopapulaire; > 50% BSA	Billirubine sanguine 103 - 255 $\mu$ M	Diarrhée > 1.5 L/jour	Capable de soins personnels, mais alité < 50% du temps
4	Érythrodermie généralisée avec desquamation bulbeuse	Billirubine sanguine > 255 $\mu$ M	Douleur sévère avec ou sans iléus	Soins personnels limités, mais alité < 50% du temps

BSA : superficie corporelle. (Selon Thomas et al, 1975)

**Tableau II – Gradation générale de la GvHD dite de Glucksberg**

<i>Grade</i>	<b>Peau</b>	<b>Foie</b>	<b>Tractus intestinal</b>	<b>Performance clinique</b>
<i>I</i>	1-2	0	0	0
<i>II</i>	1-3	1	1	1
<i>III</i>	2-3	2-4	2-3	2
<i>IV</i>	2-4	2-4	2-4	3

(Selon Rowlings et al, 1997)

**Tableau III – Gradation générale de la GvHD dite de l'IBMTR**

<i>Grade</i>	<b>Peau</b>		<b>Foie</b>	<b>Tractus intestinal</b>	
<i>I</i>	1	ou	0	ou	0
<i>II</i>	2	ou	1-2	ou	1-2
<i>III</i>	3	ou	3	ou	3
<i>IV</i>	4	ou	4	ou	4

(Selon Rowlings et al, 1997)

### 1.2.3 Pathophysiologie

Les dégâts liés à l'aGvHD sont causés par les lymphocytes T du donneur présents dans le greffon (2). Le récepteur du lymphocyte T (TCR) est situé sur les lymphocytes T et est responsable de l'activation de ces cellules. Le TCR reconnaît les antigènes allogéniques, c'est à dire qui ne sont pas génétiquement identiques, présentés par les molécules du HLA. Cependant, une molécule HLA allogénique permet aussi une activation des lymphocytes T. Cette activation enclenche l'activité des lymphocytes T qui détruisent les organes cibles, principalement la peau, le foie et le tractus intestinal.

De plus, le patient qui reçoit la greffe est dans l'impossibilité d'éliminer ces cellules réactives puisque ses défenses immunitaires ont été grandement diminuées par la chimiothérapie. Afin de préparer la réception de la greffe et de favoriser l'implantation des cellules souches, le patient reçoit un conditionnement qui élimine la majorité de ses propres cellules immunitaires, le laissant susceptible à la GvHD (12). Le dernier facteur nécessaire à l'évolution de cette maladie est la présence, chez le patient, d'antigènes que le donneur n'exprime pas ou qui présentent des différences. Ces antigènes sont essentiellement, mais pas uniquement, les molécules HLA (2).

Dans ces conditions, la GvHD se réalise en trois étapes. Premièrement, le dommage prégreffe au receveur favorisera les réactions inflammatoires. En second, les lymphocytes T du donneur seront activés par les antigènes allogéniques du receveur. Troisièmement, les cellules effectrices activées agiront par les voies cytotoxiques pour détruire les cellules étrangères.

### **1.2.3.1 La réponse en cytokines**

Le conditionnement sert à préparer le patient à recevoir la greffe. Les cellules souches hématopoïétiques sont éliminées afin de créer une niche capable de recevoir de nouvelles cellules souches et d'empêcher le rejet de ces cellules. Il permet aussi d'éliminer des cellules sanguines transformées si le patient est atteint d'un cancer hématologique. Ce conditionnement peut comporter de la radiothérapie, de la chimiothérapie et/ou des immunosuppresseurs (12).

Ce traitement est très agressif et entraîne la mort de nombreuses cellules. La mort de ces cellules cause un relargage de facteurs intracellulaires, telle l'ATP, qui stimulent les cellules présentatrices d'antigènes (APC). La mort de cellules de la paroi intestinale permet aussi aux endotoxines bactériennes, qui sont de puissants activateurs des APC, de pénétrer jusqu'aux cellules de l'immunité innée et de les activer. Les principaux composants bactériens responsables de cette sensibilisation sont les lipopolysaccharides (LPS) et l'ADN, qui activent les récepteurs de type Toll-4 (TLR-4) et TLR-9 respectivement. Tous ces facteurs poussent les cellules innées à libérer des cytokines pro-inflammatoires en grande quantité. Les APC activés jouent aussi un rôle direct dans la GvHD en provoquant l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (2, 5).

### **1.2.3.2 L'activation des cellules T**

La présence des APC activés et les cytokines activent de façon intense les lymphocytes T qui proviennent du greffon, ceux du patient étant fortement diminués suite aux prétraitements que le patient a reçus. La présentation antigénique au TCR par l'APC est le signal majeur d'activation des cellules T. C'est à cette étape que les différences HLA, les autres antigènes allogéniques du patient et les produits bactériens causent un signal de forte affinité au TCR. Cependant, ce signal dépendant du TCR n'est pas suffisant pour déclencher l'activation des lymphocytes T. Les signaux coactivateurs complémentaires absolument nécessaires à l'activation sont fournis par les axes B7/CD28/CTLA4, CD30/CD30L, CD40/CD40L, OX40/OX40L et ICOS/ICOS-L. Les ligands de ces complexes récepteurs/ligands sont aussi exprimés par les APC (2, 5).

Une fois activées, les cellules T migrent vers les tissus typiquement touchés par les ravages de la GvHD. Cette étape est cruciale, puisque l'activation des lymphocytes se produit au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules activées ont donc besoin de migrer pour effectuer les dégâts observés dans la GvHD. Les APC ont aussi besoin de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour aller activer les lymphocytes. Les récepteurs de chimiokines, notamment CCR2, CCR5, CCR6 et CCR7, font partie des signaux responsables de ces migrations. Par exemple, lorsque le récepteur CCR5 est absent à la fois chez le patient et le donneur, les patients sont très protégés de la GvHD au niveau du tractus intestinal. Le récepteur CCR5 permet aussi la migration de cellules vers le foie, mais dans ce cas, en l'absence de CCR5, le récepteur CCR1 agit de façon redondante (13).

### **1.2.3.3 Les lésions**

La dernière étape est la phase où les dégâts sont produits contre la peau, le tractus digestif et le foie. Ces dommages sont créés par l'attaque des organes cibles par les cellules T cytotoxiques (2, 5). En exerçant leur effet de mort cellulaire, les T CD8<sup>+</sup> provoquent une amplification de l'activation des T et une augmentation de la sécrétion des cytokines inflammatoires. Les cytokines les plus couramment élevées dans le contexte de la GvHD sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , et l'IL-6, mais il est possible que les cytokines de type Th2 (IL-17, IL-23 et

d'autres) soient augmentées. L'inflammation est exacerbée et se transforme alors en une « tempête » inflammatoire soutenue par une boucle de renforcement positif (2).

#### **1.2.4 Les facteurs de risque**

Au-delà des statistiques, certains facteurs bien décrits sont à tenir en compte dans le processus de transplantation, car ils peuvent augmenter le développement et la sévérité de la GvHD. Ces facteurs concernent en majorité le choix du greffon et comportent principalement : le niveau de disparité des HLA et le niveau de parenté entre le donneur et le patient, ainsi que le tissu d'où sont extraites les cellules souches (4, 14).

##### **1.2.4.1 L'appariement HLA**

Le HLA est le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) que l'on retrouve chez l'humain. Le MHC est un complexe de gènes pour des protéines impliquées dans la présentation des antigènes; il est composé de plusieurs gènes répartis en deux classes aux fonctions complémentaires. Les gènes de la classe I sont exprimés sur toutes les cellules nucléées. Leur fonction est de permettre la reconnaissance des cellules du soi et du non-soi de même que les cellules infectées ou transformées. Six gènes sont exprimés dans ces locus (HLA-A, B, C, E, F, G), mais trois d'entre eux (HLA-E, F, G) produisent des protéines qui ont pour ligand des cibles différentes du TCR ou inconnues. Onze des autres gènes présents ne sont pas traduits en protéines et sont communément appelés des pseudogènes. Les gènes des locus A, B et C produisent une protéine globuline à trois domaines, possédant des hélices alpha et un feuillet plissé. Chaque chaîne s'associe à la  $\beta$ 2-microglobuline afin d'être exprimée à la surface. Les molécules de classe I sont donc des hétérodimères (15).

La classe II comporte quant à elle deux chaînes semblables pour chaque molécule, une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ . Ces protéines sont des globulines à deux domaines, composées d'hélices alpha et de feuillet plissé, et ne contiennent pas de  $\beta$ 2-microglobuline. Les HLA de classe II sont exprimés par les APC, et sont surtout limités au compartiment hématopoïétique. Leur expression est variable et peut être stimulée par des conditions activatrices, comme la présence de certaines cytokines ou de composants viraux ou bactériens. Les protéines des régions DR, DQ et DP sont exprimées à la surface cellulaire et servent à la présentation des APC aux cellules T CD4<sup>+</sup>. Les protéines des régions DM et DO servent au chargement des antigènes

dans le HLA. Les deux chaînes, la chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  des récepteurs de classe II n'ont pas exactement la même variabilité ni la même fonction, bien qu'elles soient semblables. Les chaînes  $\beta$  sont plus polymorphiques et sont produites par les gènes DRB1 et DQB1 (15).

Dans le cadre de la transplantation, l'appariement est effectué sur dix allèles, soit les deux allèles (maternel et paternel) de chacun des gènes des HLA-A, B, C, DRB1 et DQB1 (15). L'appariement est important puisqu'une molécule HLA allogénique active les cellules T, qui causent alors la GvHD. Les TCR sont sélectionnés dans leur développement pour ne pas et réagir lorsqu'ils rencontrent des antigènes autologues présentés par un HLA lui aussi autologue. Le TCR reconnaît normalement les antigènes allogéniques sur les molécules du HLA de cellules autologues. Cependant, la liaison avec une molécule du HLA étrangère est reconnue comme allogénique par certains TCR, et est donc activatrice pour les lymphocytes T. Ces lymphocytes alloréactifs sont bien plus prévalents que les lymphocytes spécifiques contre les antigènes étrangers (16).

Bien que les technologies de typage soient grandement améliorées et qu'il soit possible d'éliminer totalement la présence de disparités pour les molécules HLA ciblées lors des greffes, les gènes ayant des rôles immunitaires situés à proximité ne sont pas étudiés. Même lorsque les HLA sont identiques, les patients recevant de donneurs non apparentés ont encore 30% de risque de développer une aGvHD au jour 100 après la greffe (14). Il est plausible que ces gènes, tel le « tumor necrosis factor » (TNF)- $\alpha$ , puissent influencer le résultat de la greffe (17).

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine inflammatoire sécrétée par des cellules du système immunitaire. Elle aboutit sur de nombreux effets et cause notamment l'apoptose, ou la mort cellulaire dans les tissus. Plusieurs polymorphismes ont été dénombrés et associés avec un risque accru de GvHD ou un risque de développer une maladie plus sévère. La présence des allèles d4 et d5 chez le donneur ou encore un défaut d'appariement au niveau du polymorphisme TNF-1031 sont des exemples bien répertoriés de telles associations (18).

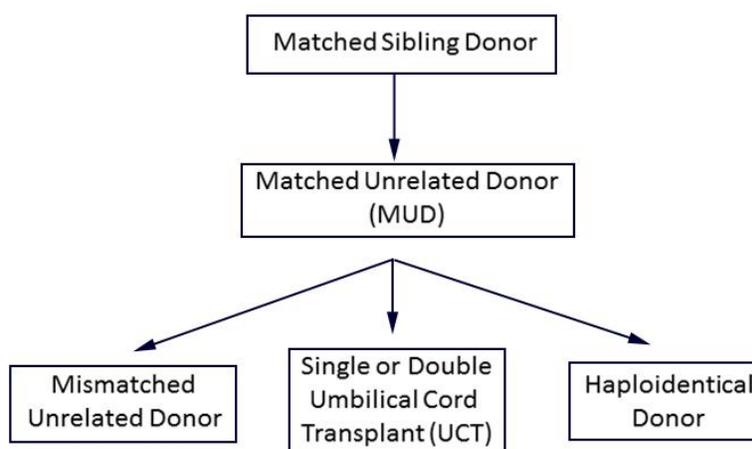
**Tableau IV - La diversité HLA**

<i>Classe</i>	<b>Locus</b>	<b>Nombre d'allèles</b>	<b>Nombre de protéines</b>
<i>Classe I</i>	HLA-A	3285	2313
	HLA-B	4077	3011
	HLA-C	2801	1985
	HLA-E	18	7
	HLA-F	22	4
	HLA-G	51	17
	Pseudogènes	43	0
	<b>Total de la classe I</b>	<b>10297</b>	<b>7337</b>
<i>Classe II</i>	HLA-DRA	7	2
	HLA-DRB	1932	1412
	HLA-DQA1	54	32
	HLA-DQB1	876	595
	HLA-DPA1	42	21
	HLA-DPB1	587	480
	HLA-DMA	7	4
	HLA-DMB	13	7
	HLA-DOA	12	3
	HLA-DOB	13	5
	<b>Total de la classe II</b>	<b>3543</b>	<b>2561</b>

Les données utilisées pour créer ce tableau proviennent de la version 3.22 de la base de données IMGT/HLA, accédée au 2 novembre 2015 (19, 20).

### 1.2.4.2 Liens familiaux

Lorsque le greffon provient d'un individu issu de la même famille que le patient, les risques de développer la GvHD sont moindres comparativement à un donneur non apparenté. Il a été avancé que les antigènes mineurs d'histocompatibilité pouvaient entrer en jeu (21-23). Ce groupe d'antigènes est connu depuis longtemps et inclut de nombreux et variés antigènes (24, 25). Une disparité dans les antigènes HA-1, 2, 4 et 5 augmente la GvHD (22). Même dans les cas où le donneur est apparenté, l'antigène mineur HA-8 a un impact sur les risques associés à la HSCT (26). Comme ces antigènes mineurs ne sont pas vérifiés systématiquement lors de la HSCT, l'utilisation d'un donneur apparenté permet d'accroître les chances de posséder une grande proportion d'antigènes mineurs identiques. Avec ces considérations, un membre familial identique pour le HLA reste un donneur de premier choix (Figure 1) (27).



**Figure 1 - Schéma de sélection des donneurs**

L'algorithme suivant est généralement accepté pour la sélection typique des donneurs de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement des maladies malignes : si un donneur apparenté compatible n'est pas disponible, un donneur non apparenté (MUD) est sélectionné; si un MUD n'est pas disponible, les choix incluent un donneur non apparenté ayant une incompatibilité HLA, une greffe de cordon simple ou double (pouvant contenir jusqu'à deux incompatibilités HLA) et un donneur haploidentique (apparenté). (Image réimprimée avec la permission de *Medscape Drugs & Diseases* (<http://emedicine.medscape.com/>), 2015, disponible au: <http://emedicine.medscape.com/article/208954-overview>)

Les « killer immunoglobulin-like receptors » (KIR) sont les récepteurs des cellules NK qui contrôlent leur activation. Il s'agit d'un groupe de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui reconnaît principalement les molécules du HLA

### **1.2.4.3 La source du greffon**

Le greffon peut provenir de plusieurs tissus : du sang périphérique, de la moelle osseuse et du sang de cordon ombilical. Des études récentes montrent que la greffe de sang de cordon diminue en général les risques de GvHD, lorsque comparée à la greffe de cellules du sang périphérique ou de cellules de la moelle osseuse (14, 28). Il est intéressant de noter que dans ces études, les cordons peuvent être greffés en possédant plus de dissemblances avec le patient au niveau du HLA que les autres sources de cellules souches (14). La plus grande permissivité des cordons permet d'améliorer la recherche de greffons compatibles. Un obstacle à leur utilisation, par contre, est le faible contenu cellulaire des cordons comparativement aux prélèvements de moelle osseuse ou d'aphérèse. Plus d'un cordon est donc souvent nécessaire pour un patient adulte. Les différences entre les sources de cellules souches pourraient en partie s'expliquer par la différence dans le contenu en cellules T matures, qui sont directement impliqués dans la pathogénèse de la GvHD. Le sang périphérique est le plus riche en cellules T matures des trois tissus, suivi par la moelle osseuse et le sang de cordon (29).

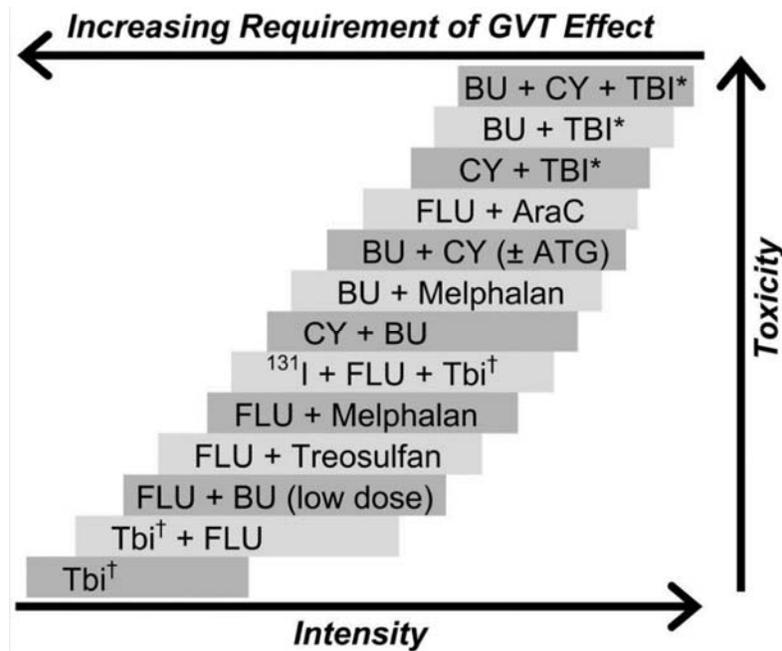
### **1.2.4.4 Autres facteurs influençant la GvHD**

Le sexe du donneur et du receveur est également à considérer. Tous les autres paramètres étant égaux, le transfert de cellules d'un individu à un individu du sexe opposé permet à certains antigènes mineurs d'histocompatibilité spécifiques au genre de déclencher la cascade de la GvHD. Ce phénomène est plus prononcé chez les hommes recevant un greffon d'une femme en raison de la présence des antigènes du chromosome Y (30).

Le statut sérologique du cytomegalovirus (CMV) est aussi vérifié lors d'une HSCT. Près de 60% de la population est positive pour le CMV. Les individus immunocompétents infectés n'ont aucun symptôme, ils ont simplement des anticorps dirigés contre ce virus. Le virus peut toutefois être transmis par le greffon si le donneur est porteur. Chez le patient immunosupprimé, comme dans la HSCT, il y a un risque que le CMV se réactive; il y a un lien entre la réactivation du CMV et l'incidence de la GvHD (31).

### **1.2.5 Les traitements actuels**

Dès la transplantation de cellules souches effectuée, il est nécessaire de fournir un traitement immunosuppresseur prophylactique aux patients. Sans ce traitement, la grande



**Figure 2 – Sélections de régimes de conditionnement d'intensités variées**

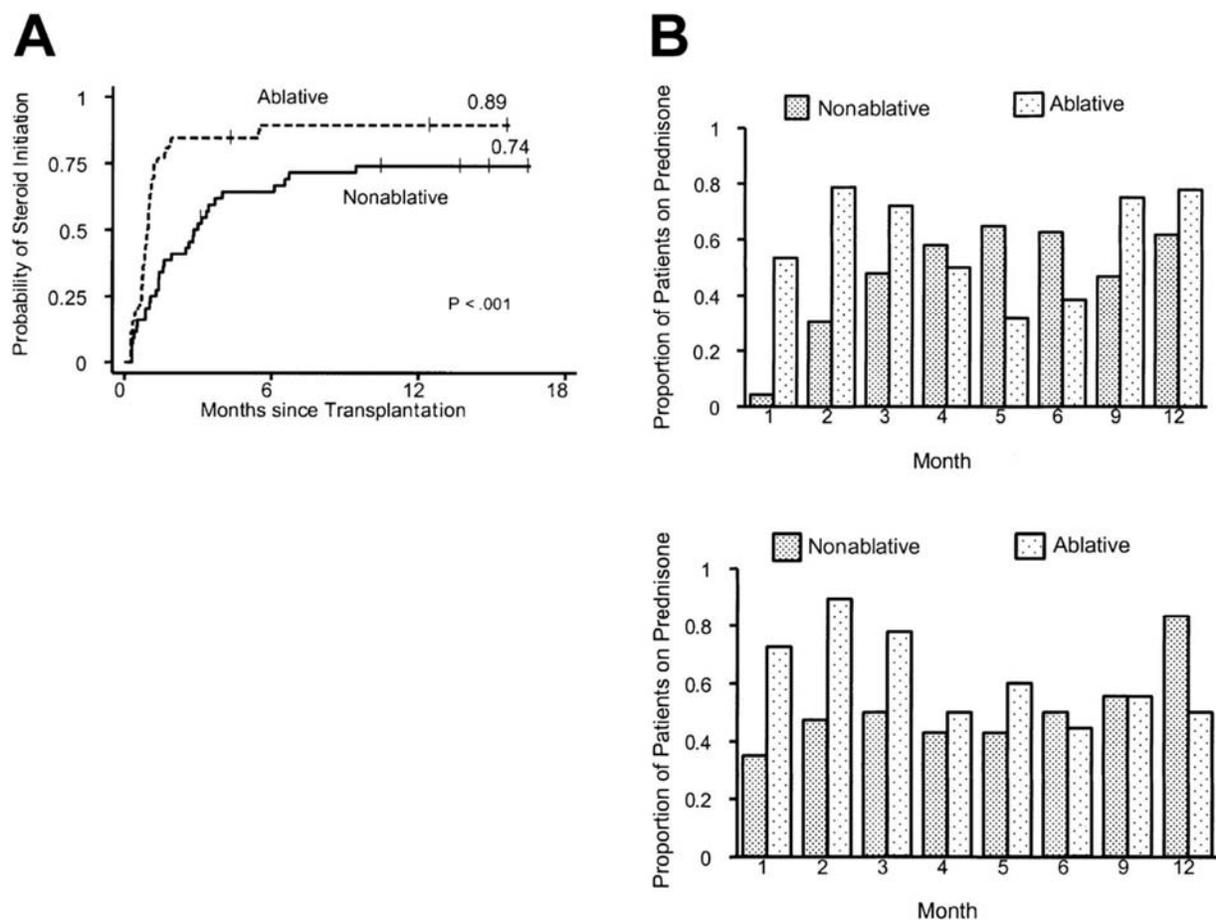
BU indique le busulfan; CY, la cyclophosphamide; TBI, l'irradiation totale du corps; FLU, la fludarabine (différents horaires d'administration); AraC, l'arabinoside de cytosine; ATG, les globulines anti-thymocytes (ou thymoglobulines); et  $^{135}\text{I}$ , un anticorps anti-CD45 couplé à du  $^{135}\text{I}$ . \* « haute dose » de TBI (800-1320 cGy). † « faible dose » de TBI (200-400 cGy). (Deeg et Sandmaier, 2010)

majorité des patients subira une GvHD et en mourra. Comme ces agents inhibent la reconstitution immunitaire, un équilibre doit être atteint; le patient doit pouvoir se défendre contre les microorganismes, tout en évitant la GvHD.

### 1.2.5.1 Traitements préparatoires

Avant même la greffe, certains paramètres peuvent être contrôlés pour diminuer l'incidence et la gravité de la GvHD. Les traitements d'induction sont des traitements agressifs qui causent des dégâts cellulaires substantiels. Ces dommages initient alors le cycle de la GvHD (2, 5). Des protocoles de conditionnement variés ont été développés pour élargir le nombre de patients admissibles à la HSCT (Figure 2); parmi ces traitements, les conditionnements à intensité réduite semblent promettre des niveaux de GvHD plus faibles que dans les autres traitements (32). Les patients recevant une thérapie préparatoire non myéloablative ont généralement moins de risque de nécessiter des thérapies immunosuppressives intenses après la greffe (Figure 3) (33).

Un autre point d'action sur le développement de la GvHD est la modification du greffon. Plusieurs stratégies ont été approchées avec des résultats prometteurs, mais certains effets secondaires sont à considérer. La plus importante modification du greffon consiste à retirer les lymphocytes T (déplétion des lymphocytes T), qui causent la GvHD, et à transplanter la fraction restante qui contient les cellules souches. Bien que ce traitement soit très efficace pour diminuer les risques de GvHD, il diminue la réponse immunitaire immédiatement après la greffe et rend le patient plus vulnérable aux infections. De plus, l'effet GvL est aussi diminué par l'élimination des cellules T du greffon. D'autres stratégies plus raffinées ont alors été proposées, tel que la



**Figure 3 – Utilisation de la prednisone pour le traitement de la GvHD après des conditionnements myéloablatifs ou non myéloablatifs**

(A) Temps à l'initiation de la thérapie à la prednisone pour la GvHD. (B) Proportion des patients dans le groupe non myéloablatif (n=44) et dans le groupe myéloablatif (n=52) continuant le traitement à la prednisone dans les douze mois suivants la transplantation. Panneau du haut, donneurs apparentés; panneau du bas, donneurs non apparentés. (Mielcarek et al., 2003)

déplétion des lymphocytes T naïfs uniquement, puisqu'il a été montré que les lymphocytes T responsables de l'initiation de la GvHD sont essentiellement les lymphocytes T naïfs contenus dans le greffon (2, 34). Les marqueurs de surface CD45RA et CD62L sont spécifiquement présents sur cette sous-population. Bien qu'une partie des lymphocytes T soient retirés du greffon, les lymphocytes T mémoire restants permettent au patient greffé de répondre aux pathogènes. Tous les pathogènes ne seront pas alors ciblés, seuls ceux contre lesquels le donneur de cellules souches a développé une immunité avant la greffe. Le cas de figure où cette stratégie n'éliminerait pas les cellules réactives responsables de la GvHD serait par exemple l'éventualité où le donneur a déjà été exposé à certains antigènes allogéniques du patient, par exemple si le donneur est une femme ayant déjà été exposée à certains antigènes (issus du père de l'enfant) lors d'une grossesse. Cette exposition permettrait aux cellules naïves réactives contre ces antigènes de devenir des cellules mémoires et de faire partie de la sélection(34).

### **1.2.5.2 Traitements prophylactiques**

Il y a une absence de consensus sur les traitements entre les centres de greffe et entre tous les pays. Les traitements prophylactiques utilisés comportaient principalement de la cyclosporine A (CsA) (35, 36). Ce composé est retrouvé aussi dans les traitements pour les patients ayant subi un traitement à intensité réduite. Son fonctionnement passe par le blocage de l'action de la calcineurine (37). Lors de l'activation des cellules T, une augmentation du calcium intracellulaire se produit, ce qui induit une modification et une activation de la calcineurine. Le rôle de cette protéine est de déphosphoryler le NFAT, qui est un facteur de transcription responsable de l'expression des gènes de l'interleukine (IL)-2 et d'autres cytokines. La déphosphorylation de NFAT lui permet d'entrer dans le noyau, donc la CsA inhibe ce processus. La CsA diminue donc toutes les réponses T, ce qui diminue la réponse immune des patients. Ce composé est de plus néphrotoxique ce qui représente une limitation sérieuse (36, 37). La dose initiale se situe autour de 3 mg/kg et, en absence de GvHD, le traitement est discontinué suite à une diminution progressive de la dose. Cette diminution a lieu entre les deux à douze mois après le début de la thérapie (35).

D'autres immunosuppresseurs sont souvent inclus avec la cyclosporine : le méthotrexate (MTX) ou le mycophénolate mophétyl (MMF). Le MTX est plus souvent inclus dans les

traitements préventifs chez les patients ayant subi un protocole myéloablatif, alors que le MMF, qui a une action immunosuppressive bien plus puissante, est plus couramment utilisé dans les cas de régime à intensité réduite (35). Le MTX est un antinéoplasique qui agit négativement sur la voie de métabolisme du folate, voie qui entre dans la production *de novo* des purines et pyrimidines (36). Il est administré à trois ou quatre reprises selon les centres, à des doses maximales de 15 mg/m<sup>2</sup> (35). Le MMF empêche la synthèse des purines, un composant de l'ADN, spécifiquement sur les lymphocytes, ce qui bloque leur prolifération cellulaire (36, 38, 39). Environ 1 à 3 g par jour sont donnés aux patients, pour une durée pouvant aller jusqu'à 2 mois en moyenne (35).

Le tacrolimus, un autre inhibiteur de la calcineurine, peut être substitué dans certains cas à la CsA, avec des conditions d'administration semblables à celles de la CsA (35). Les globulines anti-thymocytes sont des préparations d'anticorps équins ou encore de lapins dirigés contre les lymphocytes T humains après l'injection aux animaux de cellules de thymus humains, qui contiennent principalement des lymphocytes T (72%)(36). Cela donne aussi des anticorps dirigés contre des cibles non spécifiques retrouvées sur d'autres cellules du système immunitaire (40). Des doses autour de 7.5 mg/kg sont données en 2 à 4 jours (35). De façon comparable, l'alemtuzumab, un anticorps monoclonal anti-CD52, entraîne une déplétion des lymphocytes T. Cette stratégie porte le nom de sérothérapie ou déplétion *in vivo*.

Les corticostéroïdes sont utilisés dans certains centres en prévention, mais ils ne constituent pas une norme dans ce contexte (35).

### **1.2.5.3 Traitements de l'aGvHD**

En première ligne de traitement figurent ici les corticostéroïdes (35, 41). Les corticostéroïdes ont des effets qui peuvent être séparés en deux axes : les effets minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes. Ceux qui sont utiles pour supprimer les réponses immunes sont les glucocorticoïdes, les corticostéroïdes les plus utilisés sont la méthylprednisolone, la prednisone et la prednisolone (35, 36, 41). Ces composés sont aussi les moins puissants, ce qui permet de limiter les effets secondaires liés à ces médicaments (36). Les doses débutent généralement à 2 mg/kg/jour, exception faite des cas où la GvHD implique précisément le tractus digestif (35, 41). Certaines études ont investigué des dosages plus élevés,

mais n'ont trouvé aucune amélioration à ces traitements (41). Une proportion importante, soit 30 à 60%, des patients possèdent ou développent une résistance aux corticostéroïdes (9).

En cas de résistance aux stéroïdes, les patients reçoivent alors des traitements de seconde ligne. Il n'y a pas de consensus sur ces traitements et ils sont souvent personnalisés (35, 41). Ces traitements incluent majoritairement le MMF ou des anticorps anti-TNF (35).

### **1.3 Les cellules stromales mésenchymateuses**

Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) sont, par définition, des cellules multipotentes. Elles sont donc aussi appelées cellules mésenchymateuses souches. Ce sous-type de cellules possède une définition assez large : elles présentent un éventail de marqueurs de surface, notamment le CD73, CD90 et le CD105; mais ne possèdent pas certains autres marqueurs (CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 $\alpha$ , CD34, CD45 et le MHC de classe II). De plus, leur capacité de différenciation est un facteur d'identification supplémentaire : les MSC sont capables, dans des conditions ad hoc, de se différencier en ostéoblastes, en adipocytes ou en chondrocytes qui appartiennent à la lignée mésodermique (42). Certains articles démontrent aussi que ces cellules multipotentes peuvent générer des cellules se comparant aux neurones ou aux cellules pancréatiques et des hépatocytes, ce qui ferait plutôt d'elles des cellules pluripotentes (43).

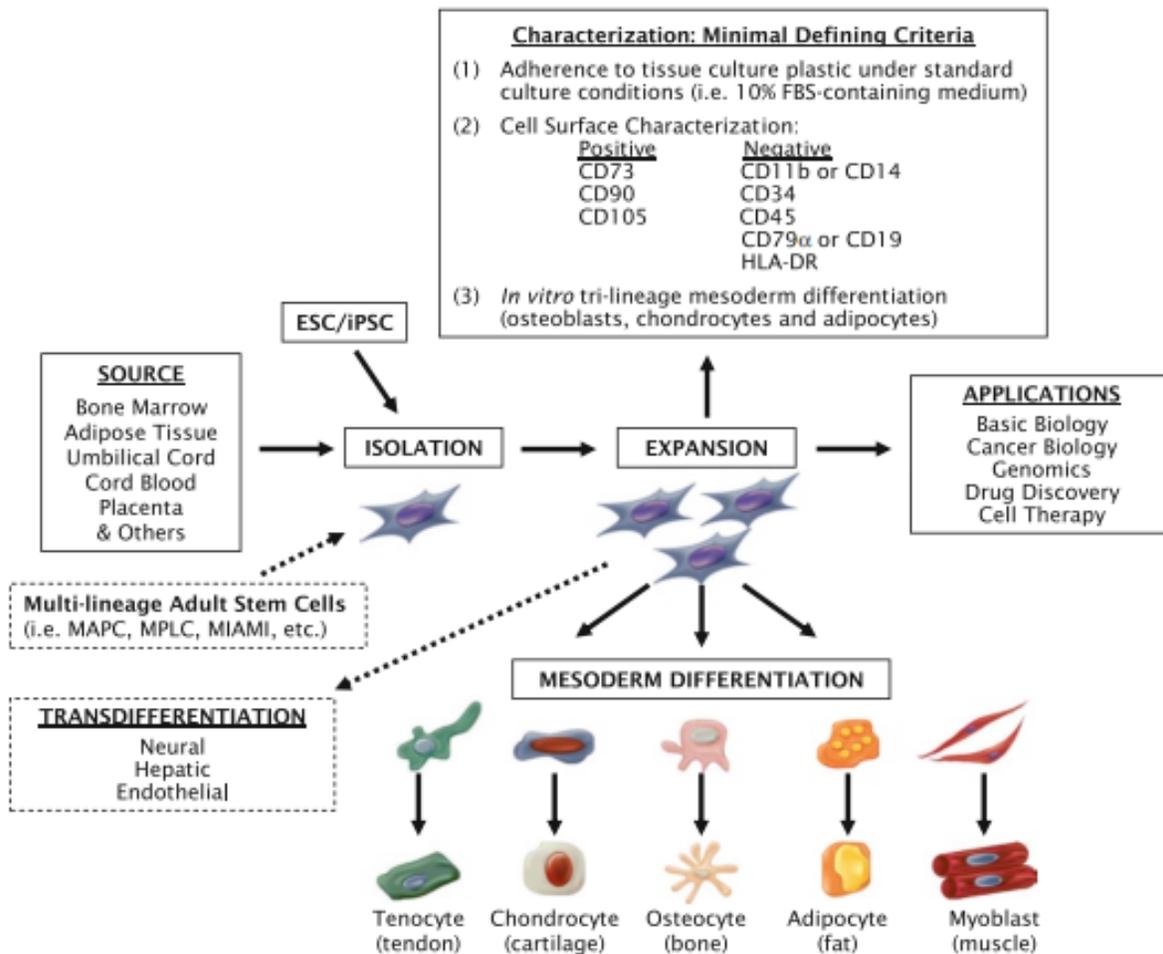
#### **1.3.1 Tissus d'origine**

Les MSC peuvent être isolées à partir de plusieurs tissus (44). Les MSC ont originalement été décrites dans des explants de la moelle osseuse de cobayes en 1970 (45). Les auteurs ont remarqué une population de précurseurs fibroblastiques, adhérents au plastique et avec une bonne capacité de prolifération. Les autres caractéristiques ont été définies subséquemment, mais des cellules partageant ces caractéristiques ont été découvertes dans la majorité des autres tissus (44). Parmi les sources les plus prometteuses pour des visées thérapeutiques nous retrouvons : le cordon ombilical (à la fois le sang de cordon (46) et le cordon lui-même avec les péricytes et le stroma (47)), les tissus adipeux (48) et le placenta (49). Certains autres tissus sont aussi étudiés comme source de MSC, comme la pulpe dentaire (50), le fluide amniotique (51), les muscles squelettiques (52) et les membranes synoviales (53).

### 1.3.2 Hétérogénéité

Malgré leur appellation commune de MSC, les cellules issues de tissus différents possèdent des particularités différentes. Les marqueurs de surface de ces cellules d'origines différentes ont été étudiés, et bien que certains marqueurs soient conservés et permettent de définir les MSC, d'autres ont une expression exclusive à certaines sources (54).

En dépit de toutes ces différences, les MSC de différentes sources possèdent de nombreuses caractéristiques identiques (Figure 4). La capacité de moduler le système immunitaire du receveur reste un facteur conservé par une majorité des MSC (55-57). De plus,



**Figure 4 – Hétérogénéité des MSC**

Les cellules mésenchymateuses souches isolées et multipliées à partir de sources diverses sont caractérisées par un ensemble minimal de critères qui les définissent et peuvent être utilisées dans plusieurs lignes de recherche et applications thérapeutiques. (Vemuri, Chase et Rao, 2011)

les cellules extraites de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical et des tissus adipeux ont des ressemblances selon des données d'analyses de transcription et d'expression protéiques dans ces types cellulaires (58).

À l'intérieur d'une population, les MSC sont aussi hétérogènes. Par exemple, les MSC peuvent être séparées en sous-populations distinctes selon leur expression de CD56, de CD271 et du mesenchymal stem cell antigen-1 (59).

Cette hétérogénéité rend difficile la recherche sur ce type cellulaire. En effet, il est encore indéterminé si toutes ces cellules constituent une seule population, bien qu'hétérogène, ou encore plusieurs lignées de cellules aux propriétés entièrement différentes (44). De plus, suite à l'activation par différents ligands du TLR peut induire des phénotypes pro ou anti-inflammatoires. Par exemple, une stimulation du TLR4 semble favoriser la voie pro-inflammatoire et augmenter la prolifération des cellules immunitaires stimulées alors que l'activation du TLR3 induit l'effet inverse (60).

### **1.3.3 Utilisations cliniques potentielles**

Plusieurs propriétés des MSC les rendent attirantes pour l'utilisation en clinique. La différenciation en plusieurs types cellulaires (Figure 4) pourrait permettre d'améliorer la réparation tissulaire dans certains cas. Ces caractéristiques pourraient notamment aider dans les cas de dommages aux tissus nerveux. Comme les MSC peuvent, sous certaines conditions, être différenciées en neurones, ils pourraient aider à régénérer les tissus nerveux (61, 62). Cela représenterait une grande avancée puisque ces tissus ont très peu de capacité régénérative et les traitements actuels pour les dommages aux nerfs et au cerveau sont très limités. D'ailleurs, plusieurs essais cliniques sont en cours en Chine où il est question de l'utilisation de MSC pour le traitement de dommages neuronaux.

Jusqu'à présent, 610 études cliniques portant sur les MSC ont été enregistrées auprès des bases de données de ClinicalTrials.gov et du Système d'enregistrement international des essais cliniques (ICTRP) qui sont administrées par les *National Institutes of Health* (NIH) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) respectivement. L'obligation d'enregistrer les études cliniques avant le début du recrutement, demandée par l'*International Committee of Medical Journal Editors* (ICJME), permet d'avoir les données à jour sur les études cliniques en cours.

Parmi ces études utilisant les MSC, 51 concernaient le traitement ou la prévention de la GvHD, ce qui représente près de 10 % des études sur le MSC. Les détails de la recherche sont présentés à l'Annexe A. D'autres utilisations potentielles incluent entre autres le traitement du diabète de type II ou de la colite ulcéreuse, applications pour lesquelles les propriétés immunosuppressives des MSC pourraient être également primordiales.

Parmi les études cliniques faisant l'usage de MSC pour traiter la GvHD, l'étude clinique portant sur le produit Prochymal a engendré beaucoup de discussions. Cette étude n'a pas démontré d'effets cliniques sur une population hétérogène. Par contre, ce même traitement semble avoir des effets bénéfiques chez les patients pédiatriques plus particulièrement (63).

#### **1.3.4 Mécanisme d'immunomodulation**

Une des grandes questions scientifiques dans ce domaine concerne le mécanisme immunomodulateur des MSC, qui reste encore en grande partie largement incompris (64). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'immunomodulation effectuée par les MSC : la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), le « TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6 » (TSG-6), l'IL-1RA, l'IL-10, l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1), le HLA-G5, le « transforming growth factor »- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), les galectines, l'adénosine et les voies FAS, « programmed cell death protein 1 » (PD-1) et Notch, mais aucun de ces mécanismes ne résume à lui seul l'activité immunomodulatrice des MSC (65).

##### **1.3.4.1 L'enzyme IDO1**

De tous ces médiateurs, l'enzyme IDO1 est probablement le plus étudié. La protéine IDO1 est une enzyme qui dégrade l'acide aminé tryptophane par la voie des kynurénines. Ces métabolites sont analogues au composé kynurénine, qui donne son nom à ce groupe de molécules. Dans un contexte métabolique, cette voie se termine par la production du cofacteur NAD<sup>+</sup>. Cette fonction est analogue à celle de l'enzyme tryptophane-2,3-dioxygénase, mais son affinité pour son substrat est plus forte, lui permettant de diminuer plus efficacement le niveau de tryptophane. La sécrétion de l'enzyme IDO1 dans les cellules en général est induite par les signaux inflammatoires, principalement l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), mais le récepteur aux hydrocarbures (AhR) a aussi été montré comme régulateur de IDO1 (66, 67).

Les implications immunitaires d'IDO1 ont débuté avec la découverte de sa présence dans le placenta. En effet, son expression protège le fœtus du rejet lors de la grossesse. De plus, certaines cellules tumorales expriment IDO1 et les patients avec de telles cellules ont un pronostic défavorable (66). Ces informations suggèrent qu'IDO1 possède un rôle immunosuppresseur; or il a été démontré que des cellules exprimant IDO1 inhibent la réponse des cellules T (68, 69). Bien que la déplétion de tryptophane soit mise en cause dans cette inhibition, il semblerait que la kynurénine ait un effet sur l'activation de mécanismes de tolérance immunitaire (70, 71). Néanmoins, l'implication d'IDO1 dans l'immunosuppression des MSC reste controversée.

L'IDO1 peut aussi avoir d'autres fonctions que son activité enzymatique. Certaines évidences pointent vers des capacités adaptatives de cette protéine en fonction de l'environnement, et plus particulièrement en fonction des cytokines (72). Ces autres fonctions sont indépendantes de sa capacité à métaboliser le tryptophane (73). Par exemple, la présence de TGF- $\beta$  permet à la kinase Fyn de phosphoryler IDO1, ce qui induit la voie NF- $\kappa$ B non classique et favorise un phénotype de tolérance (72). Au contraire, IDO1 pourrait aussi être différemment phosphorylé au niveau d'un groupe ITIM en présence d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, ce qui lui permettrait de former un dimère avec SOCS3. Le facteur SOCS3 permettrait alors la dégradation d'IDO1 pour limiter la suppression immune (72).

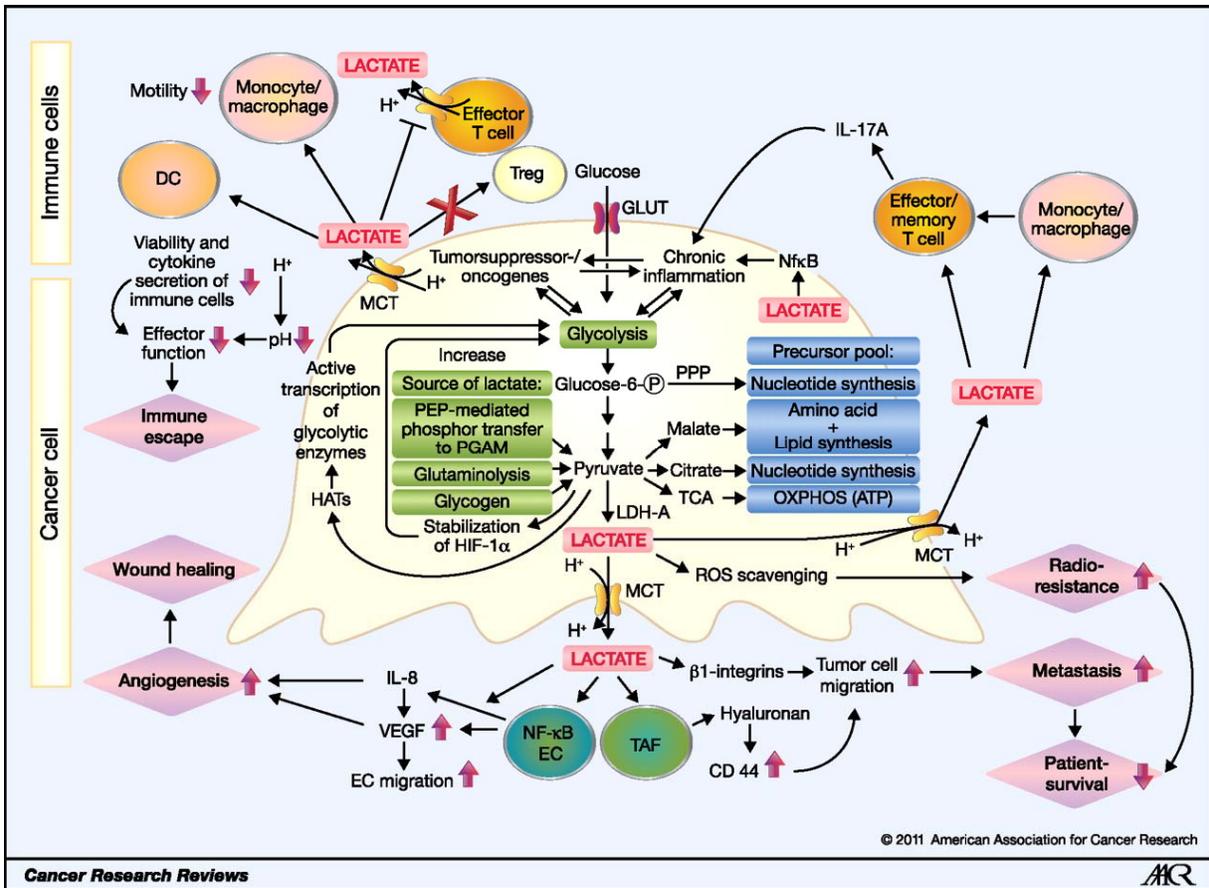
#### **1.3.4.2 Le PGE<sub>2</sub>**

Le PGE<sub>2</sub> est un dérivé de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est relâché suite à l'action de la phospholipase A2 sur la bicouche lipidique qui constitue la paroi cellulaire. Après le détachement de l'acide arachidonique, celui-ci est transformé par la cyclooxygénase (COX) constitutive, COX-1, et la COX-2 qui est inductible. Cette réaction est limitante, c'est elle qui limite la production des molécules en aval. Ces voies sont générales et sont nécessaires à la formation de tous les dérivés de l'acide arachidonique. Sous l'action des COX, la prostaglandine H<sub>2</sub> est produite et est transformée par les prostaglandine E synthases en PGE<sub>2</sub>. Il y a quatre récepteurs pour la PGE<sub>2</sub>, les récepteurs EP1, EP2, EP3, et EP4, avec plusieurs voies signalétiques en aval. La production des prostaglandines peut se faire dans toutes les cellules nucléées (74).

Le PGE<sub>2</sub> a des effets suppresseurs sur les cellules du système immunitaire inné, à l'exception des mastocytes, qui sont recrutés et activés par cette prostaglandine. La capacité cytotoxique des cellules NK, les fonctions phagocytiques des macrophages et la différenciation des DC sont entre autres affectées par le PGE<sub>2</sub>. Le système immunitaire adaptatif est lui aussi affecté par les effets du PGE<sub>2</sub>. La balance des types de réponses T est déviée des fonctions Th1 vers des réponses Th2 et Th17, qui sont moins destructrices en général. La suppression du phénotype Th1 est aussi dépendante des effets du PGE<sub>2</sub> sur certains sous-types cellulaires de l'immunité innée, tels les monocytes et DC. En plus de limiter l'action des cellules inflammatoires, le PGE<sub>2</sub> est un inducteur de cellules suppressives, tels les Tregs et les macrophages suppressifs et les cellules suppressives myéloïdes (74).

#### **1.3.4.3 Le lactate**

Le lactate est un métabolite de la respiration glycolytique anaérobie. Il est produit par la réduction du pyruvate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) et oxyde le NADH en NAD<sup>+</sup>, qui est nécessaire pour la voie glycolytique. La réaction de transformation du pyruvate en lactate est réversible (75). Trois gènes différents codent pour des enzymes de type LDH, LDHA, LDHB et LDHC. L'expression du gène LDHC est spécifique aux testicules et spermatozoïdes et est primordiale dans la fertilité des individus mâles (76). Les protéines LDH-M et LDH-H (produites par les gènes LDHA et LDHB respectivement) sont, quant à elles retrouvées dans tous les types cellulaires. Les protéines LDH-M et LDH-H forment des hétérotétramères, il y a cinq combinaisons (isoformes) possibles avec des différences d'expression selon les tissus (77).



**Figure 5 – Illustration du lactate comme un joueur clé dans le cancer**

DC, cellules dendritiques; EC, cellule endothéliale; GLUT, transporteur du glucose; IL, interleukine; HAT, acétylase d'histone; LDH, lactate déshydrogénase; MCT, transporteur monocarboxylate; PEP, phosphoénolpyruvate; PGAM, phosphoglycérate mutase; PPP, voie du pentose phosphate; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TAF, fibroblaste tumeur-associé. (Hirschhauser, Sattler et Mueller-Klieser, 2011)

Le lactate, bien qu'il soit un métabolite, possède des récepteurs et peut agir comme un intermédiaire de signalisation. Le lactate peut activer la voie NF-κB à l'intérieur des cellules (78). Un récepteur extracellulaire, HCAR1, aussi connu comme gp81, a été découvert comme un récepteur du lactate (79). Les transporteurs de la famille MCT servent, entre autres, au transport du lactate. Cette famille comporte quatre transporteurs, MCT1 à MCT4.

Par ces activités métaboliques et signalétiques, le lactate agit comme un modulateur de l'immunité (Figure 5) (78). En présence de lactate, la différenciation de DC est compromise, ce type de cellules étant très efficace pour activer les lymphocytes T (80). De plus, l'expression des TLR est diminuée sur les cellules innées du système immunitaire en présence de lactate

(81). L'activité des cellules NK est aussi diminuée par la présence de lactate (82). L'effet du lactate n'est pas limité aux cellules de l'immunité innée. Les cellules T activées utilisent principalement la glycolyse comme source d'énergie, mais l'export de lactate est inhibé lorsque la concentration extracellulaire est plus élevée, puisque les transporteurs MCT utilisent un gradient pour exporter leurs substrats. Cette accumulation de lactate bloque le métabolisme, et donc la prolifération des lymphocytes T (83).

## **1.4 CRISPR**

### **1.4.1 Origine du système CRISPR**

La technologie de CRISPR/Cas9, plus souvent appelé simplement CRISPR, a été développée à partir de composants d'un système immunitaire adaptatif retrouvé chez certaines bactéries et originalement identifié chez *Escherichia coli* (84). Trois types existent, mais les outils de génie génétique sont basés sur les systèmes de type II. Les systèmes de type I et III génèrent des dégradations de l'ADN qui ne sont pas ciblées, mais qui sont plutôt une digestion progressive de l'acide nucléique. Le type II quant à lui génère une coupure dans la double hélice, mais n'a pas d'activité exonucléase (85).

Le système bactérien de type II comprend trois composants effecteurs, les « clustered regularly interspaced short palindromic repeats » (CRISPR), le tracrARN et la protéine Cas9. La région CRISPR permet la production de plusieurs ARN courts, les crARN, comportant une séquence d'environ 20 nucléotides d'homologie avec le génome d'un virus pathogénique (le proto-espaceur) et une séquence de dimérisation au tracrARN. C'est ce composant du système qui en assure la spécificité. Le tracrARN lie à la fois le crARN et la protéine Cas9, une endonucléase. Une fois assemblé, ce système est dirigé vers des séquences ADN complémentaires au proto-espaceur. Une fois localisé, la protéine Cas9 induira une cassure double brin sur l'ADN. Afin d'éviter les dommages au génome bactérien, un motif associé au proto-espaceur (PAM), absent de la région CRISPR chez la bactérie, doit être présent pour que la coupure ait lieu. Ce PAM est spécifique à chaque bactérie. Pour faire une coupure sur une double hélice d'ADN, deux points sont requis : le proto-espaceur doit être complémentaire à la séquence et la zone ciblée doit avoir un PAM directement adjacent à la séquence complémentaire (85).

Le système de type II comporte aussi les protéines Cas1, Cas2 et peut comprendre Csn2 ou Cas4 (85). Ces protéines ainsi que Cas9 sont importantes dans l'adaptation, c'est-à-dire l'incorporation de nouveaux fragments proto-espaceurs dans la région CRISPR chez la bactérie (86).

#### **1.4.2 Adaptation du système CRISPR pour le génie génétique**

Pour l'utilisation en génie génétique, la technologie CRISPR a été adaptée et simplifiée. Tout d'abord, le crARN et le tracrARN ont été fusionnés en une seule séquence (87). Le nom de séquence guide ARN (sgARN) a été donné à cet ARN. Les protéines nécessaires pour l'adaptation du système, mais qui ne sont pas requises pour la partie effectrice du système ont été éliminées. Le système d'édition génétique consiste donc en un sgARN et la protéine Cas9. Plusieurs outils ont été créés pour faciliter le développement de sgARN tel l'outil E-CRISP (88). Plusieurs vecteurs ont aussi été fabriqués pour rendre plus faciles le clonage et l'utilisation des séquences créées (89).

La protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes* est parmi les plus utilisées en génie génétique. Elle est priorisée en raison de sa séquence PAM restreinte à NGG et elle a été assez bien caractérisée. La limitation du PAM à NGG est à la fois une limitation et un atout. Tous les endroits de l'ADN d'une cellule ne peuvent être ciblés puisque la séquence NGG doit être absolument présente, mais cela diminue fortement le risque de rencontrer des cibles secondaires indésirées. Cependant, la restriction n'est pas aussi exhaustive que pour certains autres organismes, comme *Streptococcus thermophilus* ou *Neisseria meningitidis* qui ont des séquences PAM plus longues, donc plus rares (89).

Une fois la cassure double brin effectuée, deux mécanismes permettent à la cellule de réparer l'ADN. Le « non-homologous end joining » (NHEJ) est un mécanisme prompt à l'erreur où les deux extrémités sont réattachées. Dans la réparation, des insertions ou des délétions peuvent provoquer des mutations dans le gène ciblé. Ces mutations sont aléatoires et peuvent détruire la fonction du gène. Le second mécanisme est le « homology directed repair » (HDR), où un patron, généralement le second allèle, est utilisé pour restaurer la portion abimée. Lors de l'utilisation du CRISPR un brin d'ADN avec une section entourée de régions d'homologie peut être inséré dans la cellule et peut servir à l'insertion de séquences de façon

dirigée. Certains traitements, comme le Scr7, peuvent augmenter l'incidence de ce type de réparation (90). Le Scr7 est un inhibiteur de la réparation non-homologue qui agit en bloquant la Ligase IV. Il a aussi été démontré que ce composé limite la progression tumorale dans un modèle murin.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Réactifs et milieux

Le « Roswell Park Memorial Institute medium » (RPMI)-1640, le « Minimal Essential Medium  $\alpha$  » ( $\alpha$ MEM), le sérum de veau foetal (FBS), la pénicilline / streptomycine, le « Dubelcco's Phosphate-Buffered Saline » (D-PBS) et la trypsine 0.05% ont été achetés chez Gibco. Le « Dubelcco's Modified Eagle Medium » (DMEM) vient de chez Multicell. Le Ficoll-Paque™ PLUS provient de GE Healthcare Bio-Sciences AB. La polyéthylèneimine (PEI) linéaire de masse moléculaire de 25000 a été achetée chez Polysciences Inc. La blasticidine, la puromycine, le polybrène et les particules virales shIDO (sc-45939-v) et shSCR (sc-108080) ont été achetées auprès de Santa Cruz biotechnology Inc. L'anticorps anti-IDO (clone 1F8.2; 1 mg/ml) et la membrane de PVDF Immobilon-P ont été achetés chez Millipore. L'anticorps anti  $\beta$ -actine (AC-15) est vendu par Novus Biologicals. L'anticorps chèvre anti-IgG (H/L) murin (1 mg/ml) a été acheté chez AbD Serotec. L'IL-4 et le GM-CSF ont été achetés chez PeproTech. Le LPS, le trichloroacetic acid (TCA), le p- diméthylaminobenzaldéhyde, l'indométhacine (IDM), le bleu de trypan, le « Protease Inhibitor Cocktail for Mammalian Cells & Tissue Extract » (inhibiteur de protéases), le sodium dodécylsulfate (SDS), l'IGEPAL CA-630 (NP40), le déoxycholate de sodium, le chlorure de sodium (NaCl), le Trizma-Base (Tris), l'éthylène diamine tétra-acétique, l'albumine sérique de bœuf, le persulfate d'ammonium, la glycine, le  $\beta$ -mercapto éthanol ( $\beta$ -ME), le tween 20, le méthanol, le luminol, l'acide  $p$ -coumarique et le peroxyde d'hydrogène proviennent de chez Sigma Aldrich. Le « CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit » (CFSE) est vendu par Invitrogen. L'acide acétique glacial et la tétraméthyléthylènediamine (TEMED) proviennent de Fluka BioChemika. Les anticorps anti-CD3-phycoérythrine (PE), anti-CD4-allophycocyanine (APC), ainsi que la 7-aminoactinomycine D (7AAD) et le « Violet Proliferation Dye 450 » (VPD450) sont vendus par BD Biosciences. Le « PageRuler Prestained Protein Ladder » et l'acide chlorhydrique proviennent de chez Fisher. Le « Quick Start Bradford Dye Reagent 1X » (réactif de Bradford), le bleu de bromophénol et l'acrylamide/Bis 29:1 30% viennent de BioRad.

## 2.2 Cellules stromales mésenchymateuses

Les échantillons de sang de cordons proviennent de la banque de recherche de sang de cordon du CHU Sainte-Justine avec l'approbation du comité d'éthique. Les MSC ont été isolées par adhésion au plastique, tel que précédemment décrit (91). Brièvement, les cellules mononucléées, obtenues par centrifugation sur un gradient de Ficoll-Paque™ PLUS ont été mises en culture dans du  $\alpha$ MEM complété avec 10% de FBS et 100 U/ml de pénicilline et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine. À l'apparition de colonies, les cellules sont traitées à la trypsine et remises en culture. Lors de l'expansion des cellules, le milieu est changé deux fois par semaine. Les cellules sont passées avant d'atteindre la confluence, puis remises à environ 1300 cellules par  $\text{cm}^2$ .

Une lignée cellulaire (MSC n° 907) a été établie dans le laboratoire du Dr Beauséjour par l'insertion des gènes de la télomérase humaine (hTERT) et un mutant de la CDK4. Cette lignée retient les caractéristiques phénotypiques et les capacités de différenciation des cellules originales (91). Des cellules non immortalisées (MSC n° 903) obtenues par le même processus d'adhérence au plastique ont aussi été utilisées.

## 2.3 Vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux lentiCas9-Blast et lentiGuide-Puro sont un don de Feng Zhang (numéro de catalogue Addgene 52962 et 52963 respectivement). Le vecteur lentiCas9-Blast contient la séquence codante de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* ainsi qu'un gène de résistance à la blasticidine.

La séquence guide sgIDO\_E1\_2 a été créée à l'aide de l'outil E-CRISP (88). La recherche sur E-CRISP a été effectuée sur le génome humain avec le terme « IDO1 ». Les paramètres par défaut ont été modifiés pour spécifier un knockout du gène ciblé et pour limiter la séquence PAM à « NGG ». La séquence a été choisie en fonction de l'absence de cibles secondaires, de sa présence sur tous les transcrits putatifs du gène IDO1 et de sa proximité du début de transcription. Les deux oligonucléotides partiellement complémentaires, sgIDO1\_E1\_Fw2 (5' - CACCGCACACGCTATGGAAACTCC - 3') et sgIDO1\_E1\_Rv2 (5' - AAACGGAGTTTTCCATAGCGTGTGC - 3'), proviennent de chez Integrated DNA

Technologies et ont été hybridés et phosphorylés. La séquence guide a ensuite été insérée dans le vecteur lentiGuide-Puro linéarisé par l'enzyme BsmBI (New England Biolabs). Le résultat de ligation a été transformé dans des bactéries chimiocompétentes Stbl (New England Biolabs). Le plasmide a été extrait des bactéries à l'aide du kit « QIAGEN Plasmid Maxi Kit » (Qiagen). La pureté et la concentration ont été déterminées avec un appareil ND-1000 (Nanodrop). La séquence du vecteur a été validée par profil de digestion, puis par séquençage, effectué par le service de séquençage du Centre d'Innovation de l'Université McGill et de Génome Québec.

## **2.4 Production virale**

Les virus ont été produits par la transfection au PEI des vecteurs d'enveloppement et du vecteur lentiviral approprié dans des cellules 293T. Les cellules 293T ( $2.4 \times 10^6$ ) sont mises sur une plaque de 10 cm le jour précédant la transfection. Les ADN (8,6 µg de vecteur lentiviral, 8,6 µg de pCMVΔR8.91 et 5,5 µg de pCMV-VSV-G) sont dilués dans 1,16 ml de RPMI complet. Le second mélange (93 µl de PEI linéaire dans 1,07 ml de RPMI complet) est ajouté aux ADN pour 15 minutes et est déposé goutte par goutte sur les cellules. Le milieu est remplacé par du DMEM complet après 16 heures d'incubation. Deux jours plus tard, le surnageant viral est récolté, centrifugé à 2000 RPM et filtré (0.45 µm) afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est réparti en aliquotes et gardé à -80°C.

## **2.5 Modification génétique des MSC**

Pour la transduction,  $5 \times 10^4$  MSC n° 907 ont été mises en culture et soumises à du polybrène 5 µg/ml et à du surnageant lentiviral pendant 16 heures. Pour la production de MSC exprimant le shIDO ou le shSCR, les particules virales provenant de Santa Cruz ont été utilisées. Pour la modification CRISPR, le surnageant contenant le gène de la Cas9 a d'abord été utilisé. Après trois jours, les cellules transduites avec les shARN ou la Cas9 ont été soumises à une sélection antibiotique avec de la puromycine 8 µg/ml ou de la blasticidine 7.5 µg/ml respectivement. La sélection a été maintenue une semaine; jusqu'à ce que toutes les cellules d'un puits non transduit soient mortes.

Les cellules exprimant constitutivement la Cas9 ont été transduites à nouveau selon la même technique avec un lentivirus contenant une cassette d'expression du sgIDO. Après trois

jours, les cellules ont été soumises à une sélection antibiotique avec de la puromycine 8 µg/ml. La sélection a été maintenue une semaine; jusqu'à ce que toutes les cellules d'un puits non transduit soient mortes.

Des clones ont été établis par dilution afin d'obtenir des cellules n'exprimant plus IDO. Pour faire la dilution, les cellules ont été comptées, puis remises en suspension afin d'avoir 0,7 cellule par puits pour 192 puits. Dès que les cellules ont adhéré, le nombre exact de cellules dans chaque puits est établi; seuls les puits contenant une cellule sont retenus. Lorsque des colonies sont apparentes, les cellules sont traitées à la trypsine et mises en expansion. Ces cellules retiennent les caractéristiques des cellules originales.

## 2.6 Mesure des dérivés kynuréniques

La présence de kynurénines a été mesurée par une méthode spectrométrique (92). Un volume de surnageant de culture est mélangé à un demi-volume d'une solution de 30% d'acide trichloroacétique et incubé à 50°C pour 30 minutes. Le milieu est ensuite éclairci par une centrifugation à 15400 G pendant une minute. De ce surnageant, 125 µl, sont mélangés à un volume égal de *para*-diméthylaminobenzaldéhyde (134 mM dans l'acide acétique glaciale; Sigma Aldrich) dans une plaque 96 puits style "ELISA". Les absorbances à 490 nm sont obtenues avec un lecteur spectrophotométrique de plaque.

Dans certaines expériences, les MSC seules sont testées pour la production de l'enzyme IDO1. Dans ces expériences, les MSC sont mises en culture dans un puits à fond plat et sont stimulées avec 10 ng/ml d'IFN $\gamma$  au bout de 24 heures. Le surnageant est collecté aux temps indiqués et analysé selon la méthode précédente. Une courbe de production pour les MSC normales et modifiées par le sgIDO a été établie. Le surnageant des MSC non modifiées et des MSC transduites avec le sgIDO en vrac a été collecté à différents intervalles (0, 1.5, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 et 168 heures). Les valeurs d'absorbance du test de kynurénines ont été utilisées pour produire une courbe de production en fonction du temps. La courbe a été modélisée sur la formule dite de Richard's :

$$Y(t) = A + \frac{K - A}{(C + Qe^{-Bt})^{1/\nu}}$$

Dans cette équation,  $t$  représente le temps en heures après la stimulation à l'IFN $\gamma$ ,  $Y(t)$  représente l'absorbance au test de kynurénine au temps  $t$  et  $A, B, C, K, Q$  et  $v$  représentent des constantes déterminées pour chaque type de MSC par optimisation non linéaire. Pour l'optimisation, la somme des carrés des différences entre les valeurs réelles et calculées a été minimisée. Pour chaque série de points, des valeurs approximatives pour chacune des constantes  $A, B, C, K, Q$  et  $v$  ont été estimées pour produire une courbe se rapprochant des valeurs réelles. Les valeurs ont servi de point de départ pour l'outil « solver » (Microsoft Office Excel) pour optimiser la somme des carrés. Les constantes obtenues par le calcul d'optimisation ont servi de point de départ pour une seconde optimisation.

## 2.7 Western blotting

Les protéines ont été extraites de  $5 \times 10^5$  MSC après 24 heures de culture avec ou sans IFN $\gamma$ . Brièvement, les cellules ont été détachées à la trypsine après l'incubation et lavées avec du D-PBS. Le culot cellulaire est mis en suspension dans 100  $\mu$ l de tampon RIPA (Annexe B) additionné de 1% d'inhibiteurs de protéases. Les cellules dans le RIPA sont incubées 30 minutes sur glace avec pipetage aux 6 minutes. Le lysat est ensuite centrifugé  $> 13600$  G pour 30 secondes à 4°C. Le surnageant est réparti en aliquotes et conservé à -80°C.

Les protéines totales sont quantifiées par la méthode de Bradford. Une échelle de BSA de 20 à 1  $\mu$ g/ml est utilisée pour obtenir une lecture quantitative des protéines. Les échantillons inconnus sont dilués dans l'eau distillée pour obtenir des dilutions au 10<sup>e</sup>, 20<sup>e</sup> et au 40<sup>e</sup>. Dans une plaque Nunc à fond plat, 10  $\mu$ l de chaque dilution est ajouté en double à 190  $\mu$ l de réactif de Bradford. Après 5 à 10 minutes, l'absorbance à 595 nm est déterminée pour chaque puit. Une courbe de conversion est obtenue à partir des valeurs de l'échelle et les absorbances des inconnus sont converties en concentration à l'aide de cette courbe.

Un gel d'acrylamide 12% (Annexe B) est préparé juste avant la migration. Selon la quantification de Bradford, 20  $\mu$ g de protéines sont mélangées au tampon de chargement (Annexe B) et les échantillons sont dénaturés 5 minutes à 90°C. Les échantillons sont chargés sur le gel; un puit est réservé au marqueur de masse moléculaire. L'électrophorèse dans le tampon de migration (Annexe B) est effectuée à 70 V pour 30 minutes, puis à 100 V pour 1 heure. La membrane de PVDF est préparée par trempage dans le méthanol 15 secondes, dans

l'eau distillée 2 minutes et dans le tampon de transfert (Annexe B) 5 minutes. Les protéines sont transférées du gel à la membrane préparée 1 heure à 100 V.

Après le transfert, la membrane est bloquée 1 heure dans le TBST-BSA 1% (Annexe B) à température pièce et lavée 5 minutes dans le TBST (Annexe B). L'anticorps anti-IDO est dilué 1:1000 dans le TBST-BSA 1% et est incubé sur la membrane 16 heures à 4°C. L'excès d'anticorps est lavé trois fois 10 minutes dans le TBST et l'anticorps secondaire (anti-IgG murin; 1:5000 dans le TBST-BSA 1%) est incubé 2 heures à température pièce. Deux lavages au TBST et un au TBS (Annexe B) sont effectués avant la révélation.

Les solutions A et B d'électrochimiluminescence sont mélangées (1:1) et déposées sur la membrane. Après 5 minutes, la luminescence est capturée à l'aide d'un film autoradiographique. Les anticorps sont retirés par la solution de décapage (Annexe B) durant 30 minutes. La membrane est lavée deux fois dans le PBS et soumise de nouveau au processus de blocage et aux étapes subséquentes. L'anticorps primaire est remplacé par l'anticorps anti- $\beta$ -actine (1:50000 dans le TBST-BSA 1%).

## **2.8 Obtention des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Du sang périphérique est obtenu de donneurs contrôles après la signature d'un formulaire de consentement (Annexe C). Les cellules mononucléées sont isolées du sang sur du Ficoll-Paque™ PLUS. Après une centrifugation à 400 G pendant 30 minutes, l'interface est récoltée et lavée deux fois dans du D-PBS. Les cellules sont comptées et la viabilité est évaluée au bleu de trypan (Sigma Aldrich).

Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont séparées avec le EasySep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies) par sélection négative. La pureté des cellules est vérifiée par cytométrie en flux avec les anticorps suivants : 7-AAD, anti-CD3 humain-PE et anti-CD4 humain-APC (BD Biosciences).

## **2.9 Marquage des lymphocytes**

Pour suivre la prolifération des lymphocytes, ceux-ci sont marqués avec la CFSE ou le colorant VPD450 (BD Biosciences). Jusqu'à  $1 \times 10^7$  cellules sont suspendues dans 1 ml de D-PBS. Un volume égal de la solution de colorant (1.25  $\mu$ M) est ajouté. Après sept minutes, la

réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de FBS froid et en incubant une minute sur glace. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du RPMI complet.

## **2.10 Préparation des cellules dendritiques matures**

Les cellules dendritiques matures (mDC) sont préparées tel que décrit (93). Brièvement, les cellules d'une leukaphérèse sont obtenues et les monocytes sont séparés par sélection positive avec le « EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit » (STEMCELL Technologies). Les monocytes sont mis en culture à  $1 \times 10^6$  cellules par puits dans une plaque de 6 puits dans 2 ml de milieu de différenciation de cellules dendritiques (DCA-RPMI). Le DCA-RPMI est préparé en ajoutant 50 ng/ml de GM-CSF et 10 ng/ml d'IL-4 à du RPMI complet. Aux jours 2 ou 3 et 5, 1 ml de milieu est délicatement retiré du dessus des puits et remplacé par le même volume de milieu frais. Au jour 5, 2  $\mu$ l de LPS sont ajoutés pour permettre la différenciation des cellules dendritiques immatures en mDC.

## **2.11 Réaction leucocytaire mixte (MLR)**

La réaction leucocytaire mixte (MLR) est couramment utilisée pour mesurer l'activation des lymphocytes T face à des cellules stimulatrices allogéniques (94). Nous avons modifié cette réaction afin d'isoler les composants (93). Brièvement,  $2 \times 10^5$  cellules CD4<sup>+</sup> sont marquées avec la CFSE et mises en culture pour 6 jours avec ou sans  $5 \times 10^3$  mDC allogéniques et  $2 \times 10^4$  MSC (ratio de 40:1:10), dans une plaque de 96 puits traitée pour la culture. Les mDC et les MSC sont irradiés à une dose de 50 Gy avec un irradiateur Gammacell 220 au cobalt-60. Le volume de culture est ajusté à 200  $\mu$ l avec du RPMI complet. La mesure de prolifération est effectuée par la mesure du colorant CFSE ou VPD450 en cytométrie en flux sur un cytomètre LSR Fortessa (Becton Dickinson).

Plusieurs façons de prendre les mesures peuvent être prises en compte lors de l'analyse de prolifération par la dilution de CFSE (95). De loin la plus simple est le relevé du nombre de cellules faiblement marquées divisé par le nombre total de cellules. C'est la stratégie qui a été appliquée dans tous les résultats du présent document. Les autres analyses nécessitent plus de traitement des données; elles sont basées sur la reconnaissance du nombre de divisions que chaque cellule a entreprises (95). Ce nombre de divisions peut être déterminé, car l'intensité de

fluorescence diminue de moitié à chaque fois qu'une cellule se divise en deux cellules fille. Dans le type de prolifération que nous utilisons cependant, il est impossible de distinguer les pics de prolifération puisque les divisions ne sont pas synchronisées. Cette absence de pics rend ces autres mesures impossibles à déterminer avec précision, et c'est pourquoi elles n'ont pas été utilisées ici.

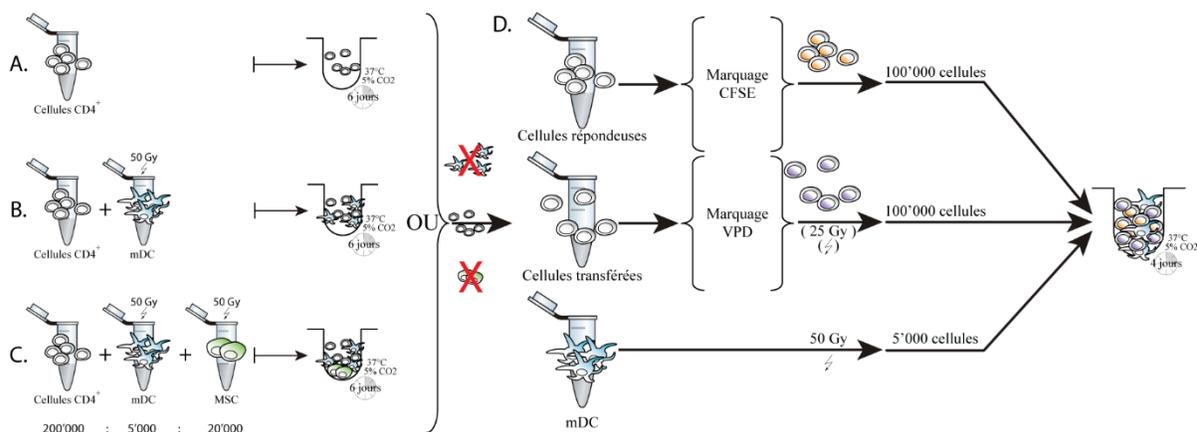
Dans les expériences de transfert de surnageant, une première MLR comme décrite précédemment a été préparée, mais avec des cellules CD4<sup>+</sup> non marquées. Après trois jours d'incubation, le surnageant a été récupéré et centrifugé pour éliminer toute cellule restante. Une seconde MLR a été préparée avec les cellules CD4<sup>+</sup> marquées et les mDC irradiés mis en suspension dans 20 µl et 180 µl de surnageant récupéré.

Certaines expériences ont été faites avec les MSC physiquement séparées, mais dans le même milieu. Les puits de type « transwell » avec une membrane dont les pores sont de 0.4 µm permettent la séparation des cellules qui partagent les mêmes facteurs solubles. Dans ces expériences, les MSC ont été mises en culture au bas du montage et les cellules répondeuses en haut avec les mDC. Pour permettre la prolifération sur un fond plat, le nombre de cellules a dû être augmenté. En respectant le ratio de 40:1:10 (CD4<sup>+</sup>:mDC:MSC), 5 x 10<sup>5</sup> cellules CD4<sup>+</sup> ont été mises en culture pour chaque puits. Les volumes dans les parties supérieures et inférieures ont été ajustés à 100 et 600 µl respectivement.

Pour les expériences où des composés (IDM, 1-MT) sont utilisés durant l'incubation de la MLR, ceux-ci sont ajoutés directement au volume de réaction. L'IDM est utilisé à une concentration finale de 10 µM et le 1-MT à une concentration finale de 1 mM. Le prétraitement à l'OXA (qui inhibe la production de lactate) est effectué directement dans le puits de réaction avant la mise en culture des cellules CD4<sup>+</sup> et des mDC. Brièvement, les MSC sont mises en culture 16 heures avant le début de la MLR dans la plaque qui sera utilisée. Après 15 heures, toutes les MSC ont adhéré au puits. Le milieu est remplacé par une solution d'OXA 2 mg/ml dans du RPMI complet. À la suite d'une incubation d'une heure à 37°C, les puits sont lavés avec du RPMI complet deux fois. Un volume de RPMI complet égal à la moitié du volume de MLR est ajouté, suivi par les lymphocytes T et les mDC.

## 2.12 Transfert de cellules CD4<sup>+</sup>

La MLR secondaire est utilisée pour tester l'effet suppresser des cellules CD4<sup>+</sup> incubées en présence de MSC. Le processus est schématisé à la Figure 6. Les conditions sont préparées comme ci-dessus, mais les cellules CD4<sup>+</sup> ne sont pas marquées à la CFSE. Après 6 jours, les cellules sont mises en suspension par pipetage et récupérées. Les MSC résiduelles qui peuvent avoir été détachées par un pipetage vigoureux sont éliminées par un passage dans une plaque à fond plat; les MSC sont des cellules adhérentes contrairement aux lymphocytes CD4<sup>+</sup>, qui peuvent alors être récupérés. Typiquement, les contenus de puits d'une même condition sont mis en commun dans une nouvelle plaque et les cellules sont incubées pour permettre aux MSC de s'attacher. Le contenu est par la suite récupéré délicatement afin de ne pas détacher les MSC. Les cellules obtenues sont donc totalement enrichies en lymphocytes T, puisque les mDC irradiés ne survivent pas 6 jours en culture et que les MSC résiduelles sont éliminées par attachement.



**Figure 6 – Schéma du transfert de cellules**

Une première réaction est mise en place dans diverses conditions (A-C). (A) Des cellules CD4<sup>+</sup> seules, avec (B) des cellules dendritiques matures (mDC) ou avec (C) des mDC et des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) sont mises en culture durant six jours à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. (D) Une seconde réaction est mise en place avec des cellules provenant de la première culture marquées au colorant VPD450 et irradiées dans certains cas. Des cellules autologues CD4<sup>+</sup> marquées au colorant CFSE sont aussi ajoutées à un ratio de 1 :1 avec les cellules transférées et des mDC à un ratio de 1 :40 avec les cellules T totales. Cette réaction secondaire est incubée 4 jours dans les mêmes conditions que précédemment.

Les cellules récupérées sont marquées avec le colorant VPD450 tel que décrit plus haut. Le marquage de ces cellules permet l'identification de l'origine des cellules CD4<sup>+</sup> dans la

réaction secondaire. Ainsi, les cellules transférées ne peuvent pas confondre la lecture de prolifération des cellules répondeuses. Sauf lorsque spécifié, les cellules sont ensuite soumises à 25 Gy de radiation avec un irradiateur Gammacell 220 au cobalt-60. Ces cellules sont mises en culture avec des cellules CD4<sup>+</sup> autologues marquées à la CFSE à un ratio 1:1 et des mDC sont ajoutés à un ratio 1:40 avec les CD4<sup>+</sup> totales, comme dans la MLR primaire. Cette MLR est incubée 4-5 jours à 37°C.

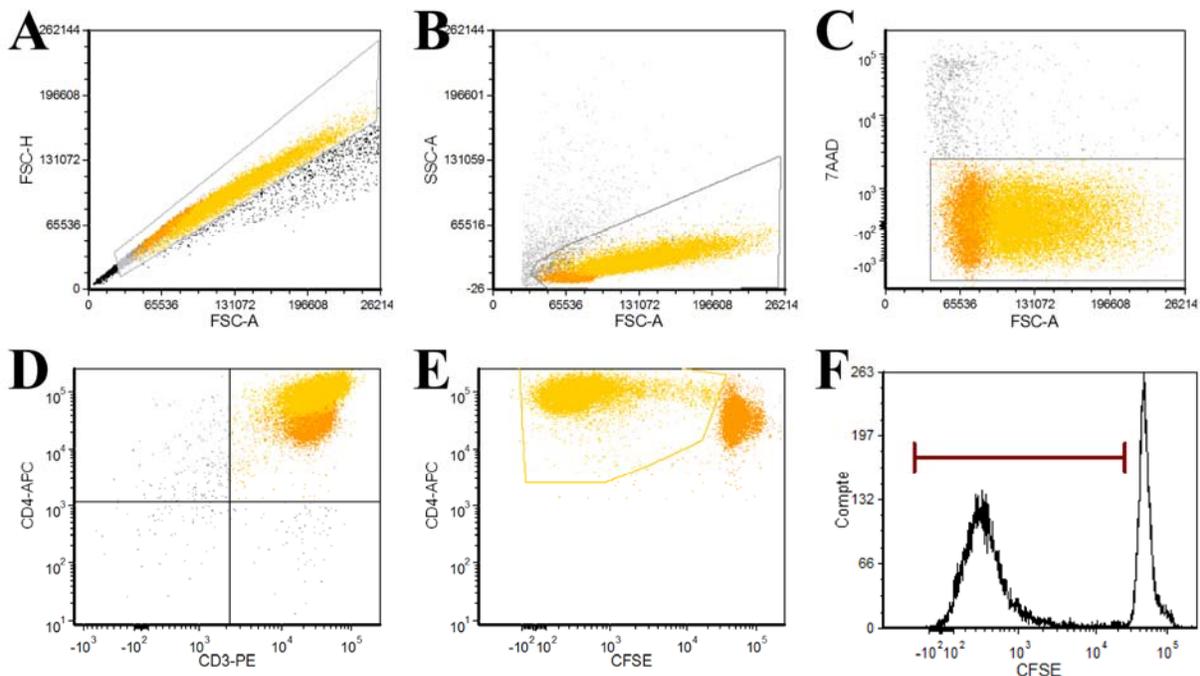
### **2.13 Statistiques**

Les valeurs statistiques ont été calculées avec le test ANOVA suivi par le post-test de Tukey. Lorsque seulement deux groupes étaient présents, le test T de Student a été utilisé. L'ensemble informatique R version 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing) a été utilisé pour effectuer les analyses statistiques et produire les graphiques (96).

### 3. RÉSULTATS

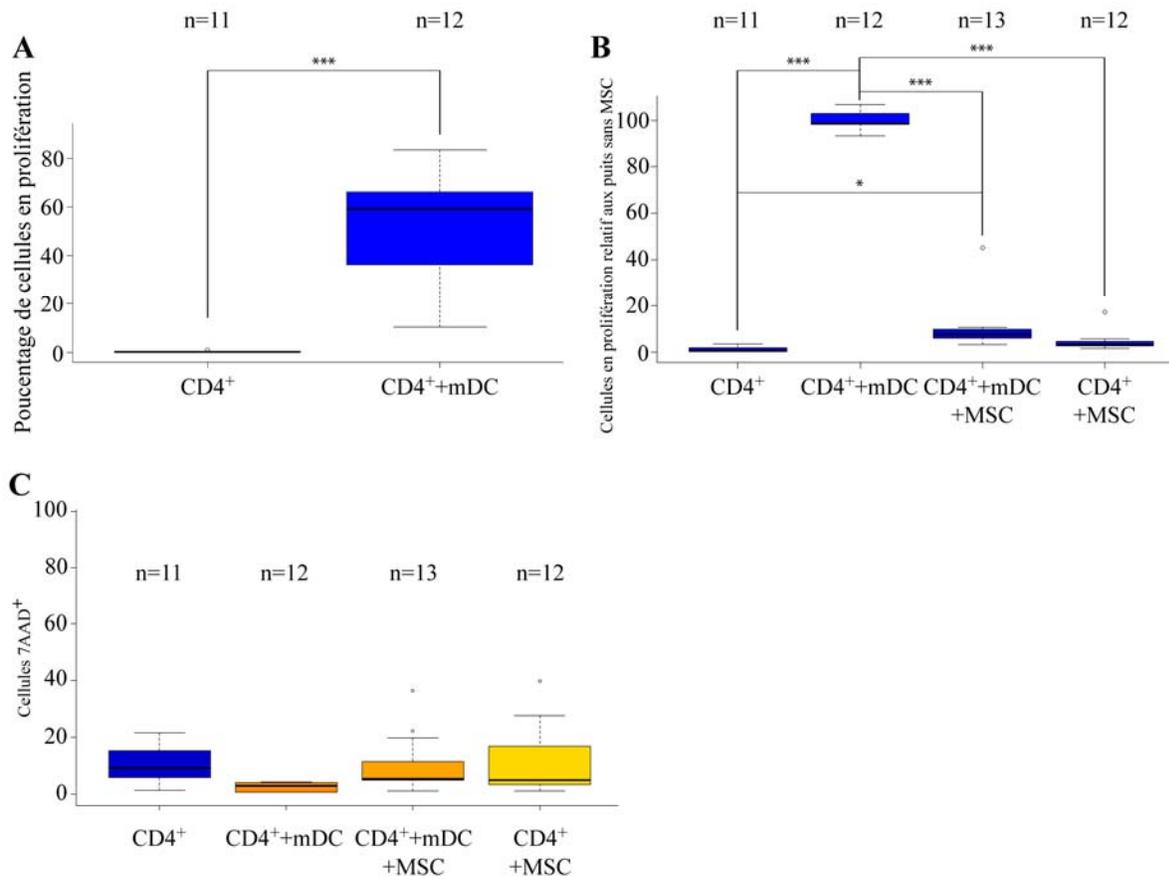
#### 3.1 Validation du modèle

Les MSC sont reconnues pour être capables de moduler la GvHD selon certaines études cliniques. En effet, les MSC pourraient influencer directement les lymphocytes T responsables de la GvHD. Pour valider l'efficacité des MSC dans notre modèle, les cellules CD4<sup>+</sup> sont stimulées par des cellules dendritiques allogéniques avec ou sans MSC et la prolifération est mesurée à l'aide de la dilution du colorant CFSE (93). Après 6 jours, la prolifération est évaluée par cytométrie en flux. Pour l'analyse des résultats de cytométrie, les doublets sont exclus et les lymphocytes sont sélectionnés par leurs propriétés physiques (paramètres FSC-A, FSC-H et



**Figure 7 – Stratégie d'acquisition en cytométrie en flux**

Les panneaux suivent l'ordre de gauche à droite et de haut en bas; chaque panneau subséquent représente les cellules isolées dans la boîte du panneau précédent, sauf le panneau (F) qui découle du panneau (D). Les cellules orangées sont les cellules qui ne prolifèrent pas, alors que les cellules jaunes sont en prolifération. (A) Les doublets sont éliminés selon la forme. (B) Les lymphocytes sont sélectionnés selon leur forme. (C) Les cellules mortes sont exclues par le marqueur 7AAD. (D) Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont sélectionnées selon leur expression des marqueurs CD3 et CD4. (E) La dilution de la fluorescence de la CFSE est visualisée contre l'expression de CD4. (F) La dilution de CFSE dans toutes les cellules CD4<sup>+</sup> est visualisée sur un histogramme.



**Figure 8 – Validation du modèle de stimulation**

(A) La stimulation de cellules CD4<sup>+</sup> par des cellules dendritiques matures (mDC) provoque leur stimulation, telle que mesurée par le pourcentage de cellules en prolifération. (B) En référence au nombre maximal de cellules en prolifération (condition CD4<sup>+</sup>+mDC), l'ajout de cellules stromales mésenchymateuses (MSC) dans la co-culture empêche la prolifération de la majorité des cellules. (C) Le pourcentage de cellules 7AAD<sup>+</sup> dans les différentes conditions.

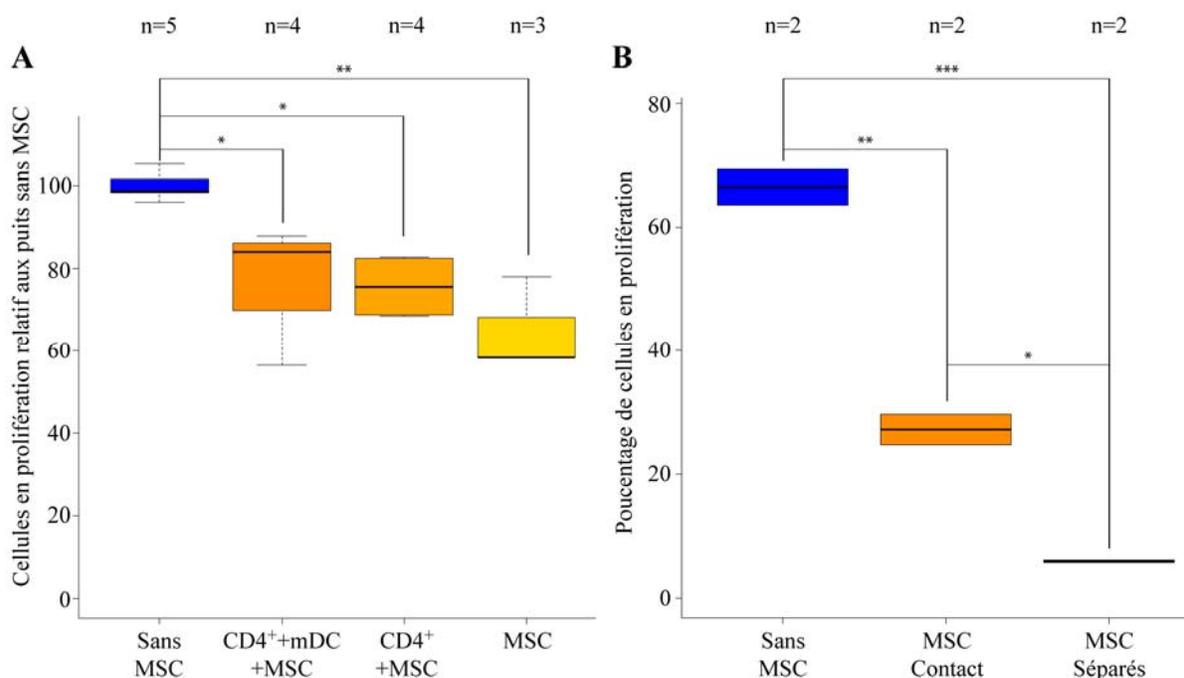
SSC-A). Parmi les lymphocytes, les cellules mortes sont exclues par l'utilisation de la 7-amino-actinomycine D (7-AAD). Parmi les cellules vivantes, les cellules T auxiliaires, qui sont CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, sont sélectionnées et la prolifération est mesurée comme une décroissance de fluorescence en CFSE sur ces cellules (Figure 7), puisque la fluorescence diminue de moitié à chaque division cellulaire.

Les mDC sont efficaces pour induire l'activation des lymphocytes allogéniques. À six jours après le début de la culture avec des APC, 60% des cellules ont un niveau plus faible de CFSE, donc ont proliféré (Figure 8A). En revanche, la présence de MSC dans la coculture diminue le nombre de cellules en prolifération d'en moyenne 90% (Figure 8B). Ces résultats

semblent confirmer la validité du modèle. De plus, l'ajout de MSC dans les conditions de MLR ne semble pas augmenter le nombre de cellules en apoptose (7AAD<sup>+</sup>) dans notre modèle (Figure 8C).

### 3.2 Nature soluble du médiateur

Afin de diriger nos recherches, nous avons testé si le médiateur de l'immunosuppression est soluble ou attaché à la surface des MSC. Avoir cette information permet d'emblée d'éliminer certains mécanismes. Tout d'abord, nous avons récolté du surnageant de réactions MLR et nous l'avons transféré sur des cellules CD4<sup>+</sup> stimulées par des mDC tel que dans une MLR normale. Le surnageant issu de conditions dans lesquelles des MSC étaient présentes inhibe légèrement la prolifération de cellules dans le second puits (Figure 9A). Nous avons voulu tester un système plus représentatif de notre modèle en utilisant un système de « transwell ». Les cellules CD4<sup>+</sup> répondeuses ont été mises en culture dans le haut du système avec des stimulateurs mDC. Les



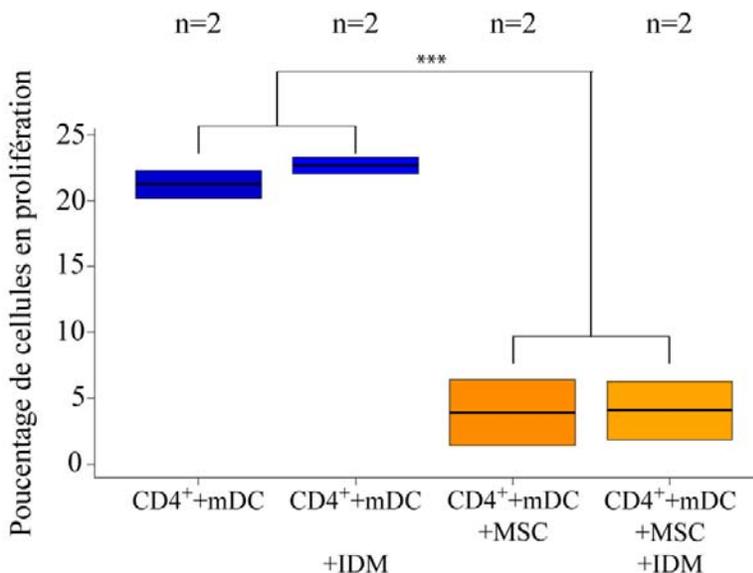
**Figure 9 – Indépendance du contact pour le mécanisme d'action des MSC**

(A) Transfert de surnageant des conditions spécifiées vers une condition comportant des cellules CD4<sup>+</sup> et des mDC. Le transfert est effectué au jour 3 de la première réaction. La diminution du nombre de cellules en prolifération dans la seconde réaction est observée. (B) La réaction de stimulation est effectuée dans un système « transwell » sans MSC, avec les MSC dans le même compartiment que les cellules répondeuses (condition Contact) ou dans le compartiment physiquement séparé (condition Séparé).

MSC ont été mises en culture au haut ou au bas du système. Le pourcentage de cellules en prolifération a été diminué par les cellules inhibitrices en contact (en haut) avec les cellules CD4<sup>+</sup> (Figure 9B). Avec les MSC séparées des cellules répondeuses (en bas), le pourcentage de cellules en prolifération était encore plus diminué. Il apparaît donc que le contact n'est pas requis pour l'inhibition des cellules CD4<sup>+</sup> par les MSC.

### 3.3 Inhibition des enzymes COX-1 et COX-2

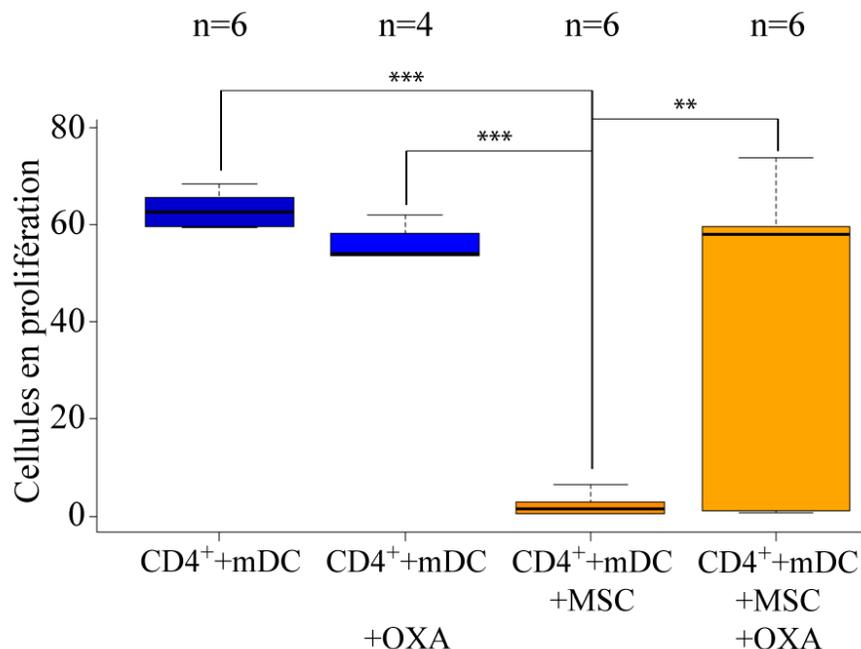
Les enzymes COX-1 et COX-2 sont responsables de la formation des prostaglandines, notamment la PGE<sub>2</sub>. Or, cette molécule est connue pour bloquer la prolifération des lymphocytes T. Nous avons voulu tester l'hypothèse que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les MSC pouvait être due à la PGE<sub>2</sub> sécrétée par les MSC. Pour inhiber les enzymes COX-1 et 2 nous avons utilisé l'indométacine (IDM). Ce composé a été utilisé tel que décrit dans la littérature, mais il n'a pas eu d'effet sur l'inhibition de la prolifération par les MSC (Figure 10). Ce résultat suggère que le PGE<sub>2</sub> n'est pas impliqué dans le phénomène observé.



**Figure 10 – Effet des dérivés des cyclooxygénases sur l'inhibition par les MSC**

Les conditions sans cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et avec ont été traitées avec l'inhibiteur indométacine (IDM).

### 3.4 Inhibition du lactate



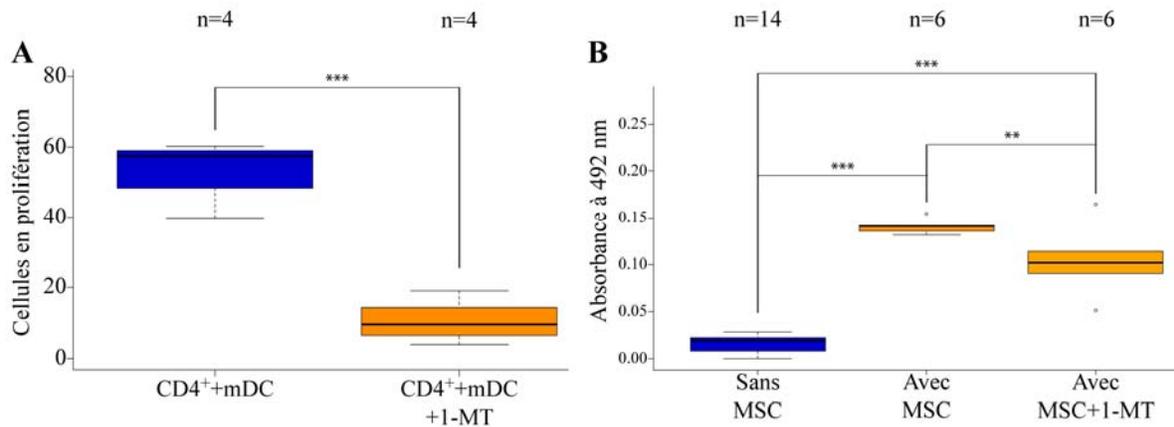
**Figure 11 – Effet de l’OXA sur les propriétés des MSC**

Effet de prétraitement des puits avec ou sans cellules stromales mésenchymateuses (MSC) avec l’acide oxamique (OXA) sur la prolifération des cellules répondeuses CD4<sup>+</sup>.

Le lactate est une autre cible de choix en tant que médiateur de la modulation faite par les MSC. Il est sécrété en grande quantité par les MSC et est responsable de l’atténuation des réponses immunitaires dans certaines tumeurs. Un prétraitement effectué avec l’OXA permet de bloquer l’enzyme LDHA chez les MSC. Nous avons donc mis en culture les MSC 16 heures avant le début de la MLR pour leur permettre de bien adhérer au fond de la plaque. Avant la mise en culture des cellules CD4<sup>+</sup> et des mDC, les MSC ont été incubées avec 2 mg/ml d’OXA durant une heure. Après le traitement, les puits ont été lavés avec du RPMI complet et les cellules stimulatrices et répondeuses ont été ajoutées. Avec le traitement à l’OXA, on observe une réversion de l’inhibition faite par les MSC (Figure 11). Néanmoins, le degré de réversion fluctue beaucoup avec ce traitement.

### 3.5 Inhibition de l’enzyme IDO1

L’enzyme IDO1 est suspectée comme étant un joueur clé dans l’immunomodulation, bien que certains articles disputent l’implication de cette enzyme. Le composé 1-MT a été utilisé

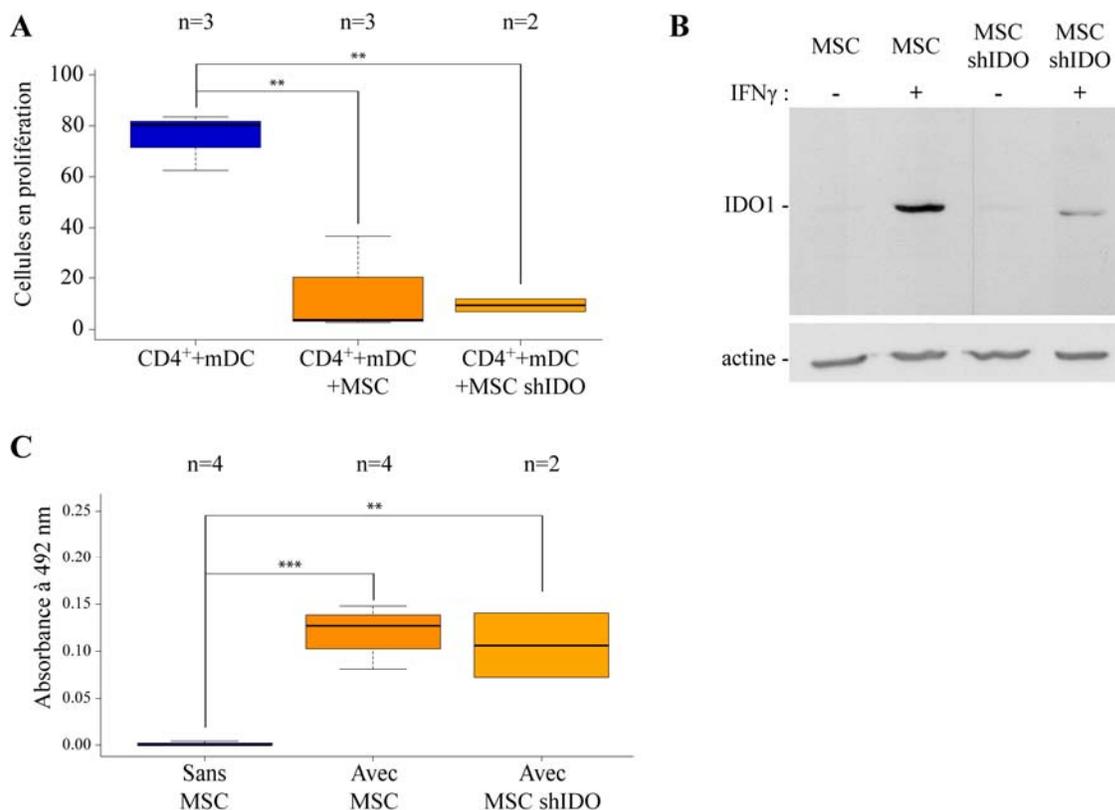


**Figure 12 – Utilisation du composé 1-MT dans la MLR**

(A) Le composé 1-méthyl tryptophane (1-MT) est ajouté à la réaction leucocytaire mixte (MLR). (B) Absorbance au test de kynurénines sur du surnageant de MLR. Dans certains puits le 1-MT a été ajouté.

pour bloquer l'activité enzymatique de l'IDO1, tel que décrit dans la littérature. Dans notre modèle, aux concentrations utilisées dans certains articles de référence, le composé a un effet aussi sur les lymphocytes en prolifération (Figure 12A). Cette inhibition nous empêche de conclure sur l'action de l'enzyme IDO1 dans la réaction MLR. Les lymphocytes T sont dépendants de l'acide aminé tryptophane. Cet effet pourrait donc être dû à un effet du 1-MT, qui est un analogue du tryptophane, sur les processus de transport ou de métabolisme du tryptophane dans ces cellules T. De plus, le 1-MT diminue la production de kynurénines par les MSC, mais cette diminution est faible comparativement aux conditions sans MSC (Figure 12B).

Pour contourner cet effet, nous avons utilisé une lignée MSC exprimant un ARN interférant de type shARN dirigé contre le gène IDO1. L'efficacité de cet ARN interférant, désigné shIDO, a été vérifiée par western blot (Figure 13B). Bien que l'interférence diminue la production de l'enzyme IDO1 après une stimulation à l'IFN $\gamma$ , elle n'est pas abolie totalement. Avec ces cellules modifiées, il ne semble pas y avoir de différences par rapport à la modulation des cellules non modifiées (Figure 13A). Les surnageant des MLR effectuées dans différentes conditions ont été récupérés à la fin de la réaction et ont été testés pour la présence de kynurénines, qui servent de mesure de l'activité de l'enzyme IDO1. Bien que l'enzyme soit diminuée avec les cellules shIDO, la fraction résiduelle est suffisante pour produire des niveaux de métabolites équivalents à ceux produits dans une réaction normale (Figure 13C). Cela nous

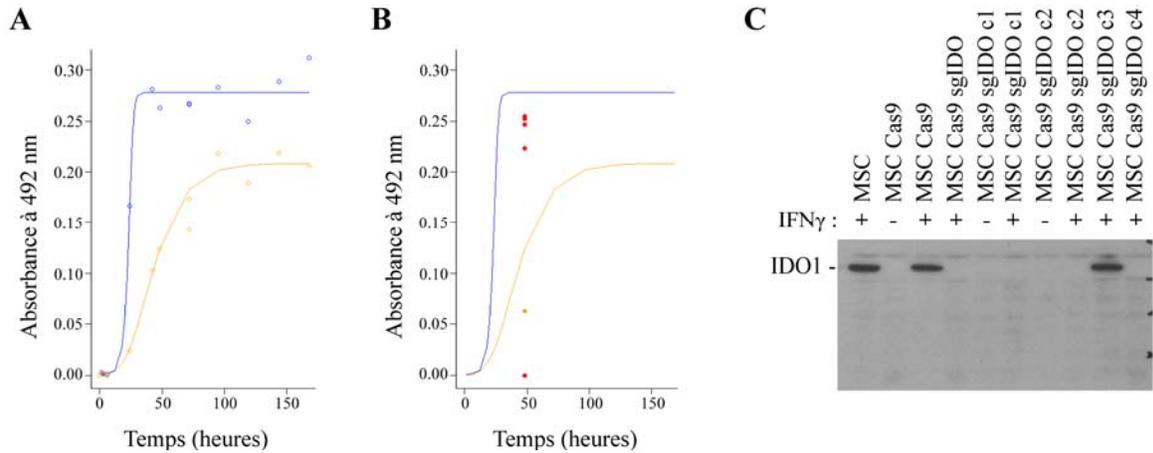


**Figure 13 – Suppression de l'enzyme IDO1 par ARN interférant**

Des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) ont été modifiées de façon stable pour exprimer un ARN interférant contre IDO1 (MSC shIDO). (A) Le nombre de cellules CD4<sup>+</sup>, stimulées par des cellules dendritiques matures (mDC), en prolifération a été comparé avec ou sans MSC (non modifié ou avec le shSCR) ou MSC shIDO. (B) L'expression résiduelle d'IDO1 a été évaluée 24 heures après une stimulation ou non à l'IFN $\gamma$  de MSC non modifiées ou exprimant le shIDO. (C) La production résiduelle de kynurénines dans le surnageant de MLR avec ou sans MSC (non modifié ou avec le shSCR) ou MSC shIDO a été évaluée.

suggère donc que notre stratégie par ARN interférant n'était pas assez efficace pour complètement inhiber l'IDO1.

Nous avons alors utilisé une lignée de MSC dont le gène de l'IDO1 a été inactivé sur les deux allèles par la technique de CRISPR. La production de kynurénines a été évaluée à différents temps pour obtenir une dynamique de production. Les deux conditions, transduites ou non, atteignent toutes deux un maximum d'accumulation avant 48 heures post-stimulation. Les MSC non modifiées atteignent un niveau de kynurénines en solution plus élevé et produisent plus rapidement les kynurénines que les cellules modifiées (Figure 14A). La modification de la

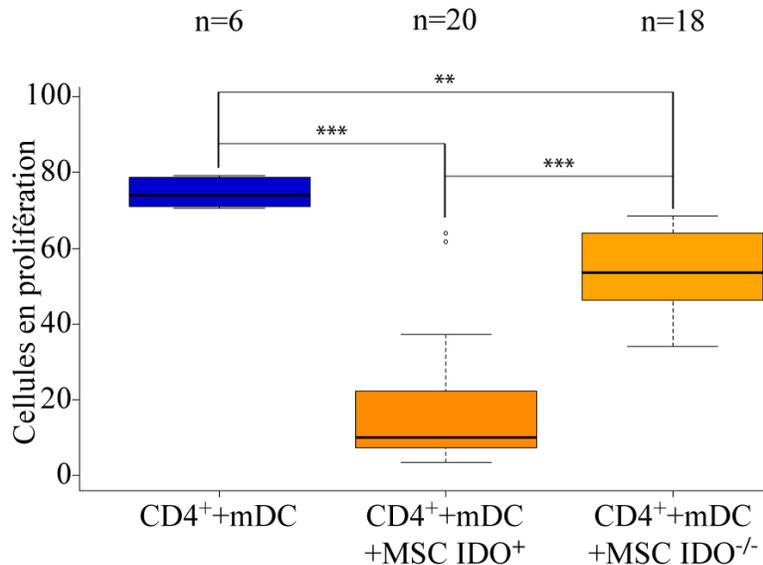


**Figure 14 – Suppression de l'enzyme IDO1 par modification génétique**

(A) Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) non modifiées (bleu) et transduites avec la construction CRSIPR sgIDO (orange) ont été activées par l'IFN $\gamma$ . Le surnageant a été testé par le test de kynurénines à différents temps (points ouverts). Ces valeurs ont servi à calculer une courbe modèle (ligne). (B) Les clones isolés de cellules transduites avec la construction sgIDO (rouge) ont été activés par l'IFN $\gamma$ . Le surnageant a été testé par le test de kynurénines à 48 heures après l'ajout de l'IFN $\gamma$ . Les résultats sont comparés aux courbes modèles établies. (C) Les différentes MSC ont été stimulées par l'IFN $\gamma$  pendant 24 heures et les protéines ont été extraites. La protéine IDO1 a été visualisée par western blot.

dynamique de production semble indiquer que la modification génétique, sur la population hétérogène, a été efficace pour affecter l'enzyme IDO1 sur certaines cellules. Des clones originaires d'une seule cellule initiale ont été établis. Les clones établis ont été vérifiés pour leur capacité à produire des kynurénines en réponse aux IFN $\gamma$  à 48 heures après la stimulation (Figure 14B). Le statut de l'enzyme IDO1 a été validé par western blot sur les clones c1 à c4 (Figure 14C). Cela confirme que les clones c1, c2 et c4 ne possèdent plus le gène fonctionnel de l'IDO1. Le clone c3, qui produit toujours l'enzyme malgré la sélection sert de contrôle dans les expériences. Les cellules IDO1<sup>-/-</sup> ont une apparence et un comportement identique aux cellules contrôle. Leurs morphologies, telle que vue au microscope à contraste de phase, est représentative des cellules originales. La vitesse de division des différents clones et de la population originale est aussi similaire. Ces cellules cependant ont une capacité d'inhibition qui est significativement diminuée comparé aux cellules IDO<sup>+</sup> (Figure 15), suggérant que l'IDO1 joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les MSC.

Les MSC IDO1<sup>-/-</sup> ont été incubées en coculture avec les cellules répondeuses CD4<sup>+</sup> et les cellules stimulatrices mDC comme précédemment. Les MSC qui ont été modifiées perdent



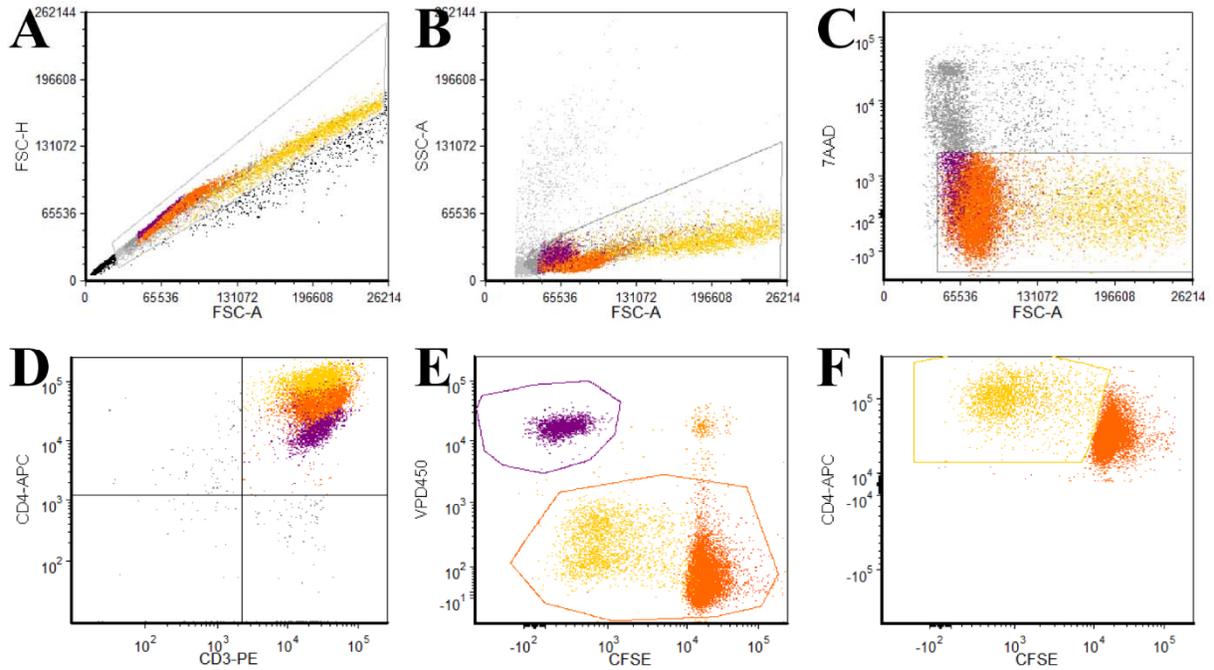
**Figure 15 – Fonction des MSC IDO<sup>-/-</sup>**

Les clones de cellules stromales mésenchymateuses (MSC) IDO<sup>-/-</sup> ou des MSC IDO<sup>+</sup> ont été utilisés dans une réaction leucocytaire mixte (MLR).

une partie de leur potentiel modulateur sur les lymphocytes T auxiliaires (Figure 15). La prolifération normale, relative au contrôle des lymphocytes en présence d'APC seulement, n'est cependant pas entièrement restaurée. Cela pourrait supposer qu'une autre voie possiblement secondaire est aussi impliquée dans la modulation.

### 3.6 Validation de la technique de transfert

La thymidine tritiée est un élément radioactif utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire. Il a été publié précédemment avec cette technique que des cellules CD4<sup>+</sup> incubées en présence de mDC allogéniques et de MSC exerçaient un effet inhibiteur lorsqu'elles sont transférées à une nouvelle MLR (93). Nous avons substitué l'utilisation de marqueurs fluorescents à cette technique bien établie. Dans ce but, nous avons marqué les cellules transférées avec le colorant VPD450. Les cellules répondeuses sont suivies avec une seconde couleur, la CFSE. Après 4 jours d'incubation, la prolifération cellulaire des cellules T CD4<sup>+</sup> est visualisée par cytométrie en flux. Pour l'analyse des résultats de cytométrie, les doublets sont exclus et les lymphocytes sont sélectionnés par leurs propriétés physiques (paramètres FCS-A, FSC-H et SSC-A). Parmi les lymphocytes, les cellules mortes sont exclues par l'utilisation de la 7-amino-actinomycine D (7-AAD). Parmi les cellules vivantes, les cellules T auxiliaires, qui



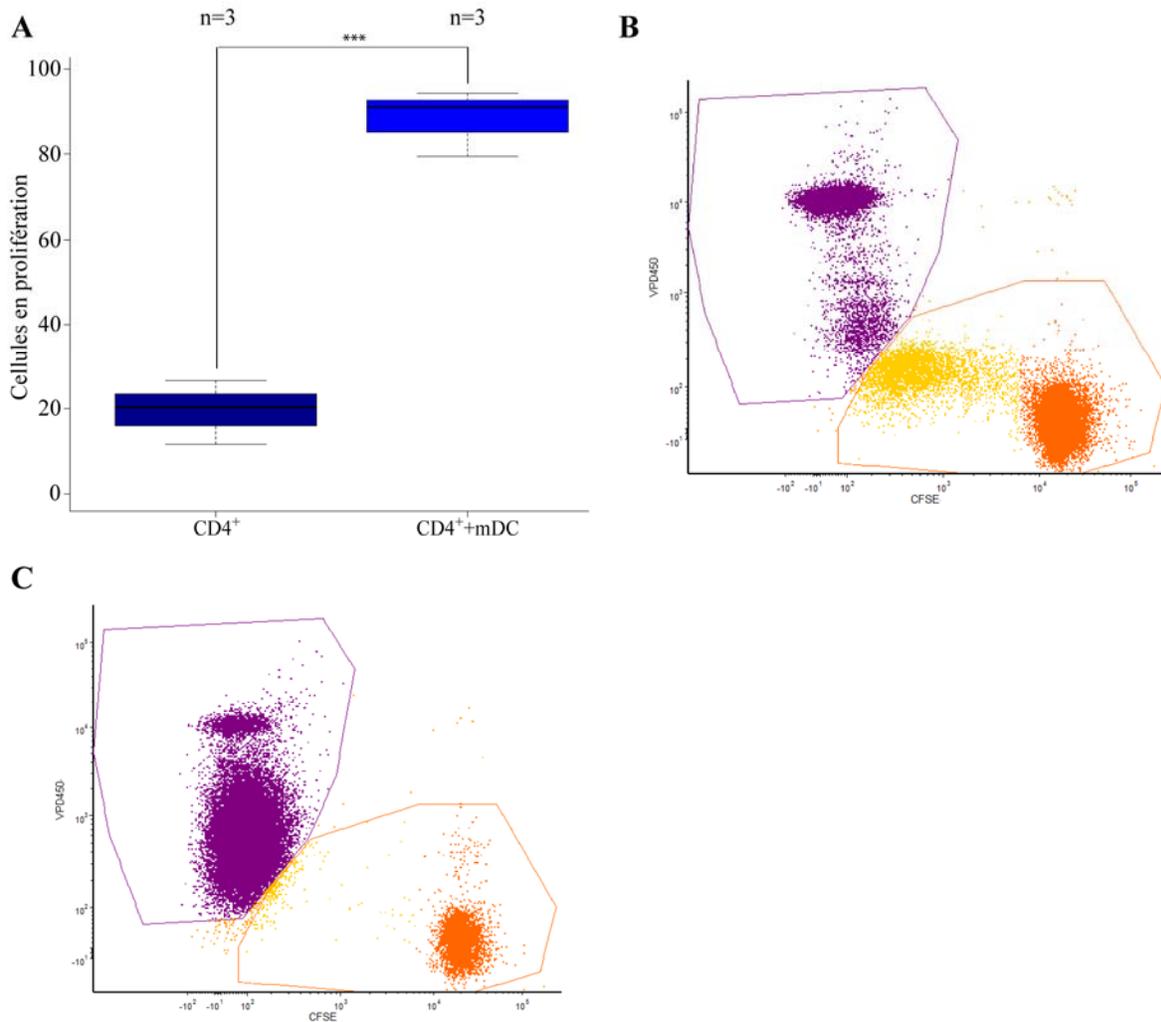
**Figure 16 – Stratégie d’acquisition en cytométrie en flux**

Les panneaux suivent l’ordre de gauche à droite et de haut en bas; chaque panneau subséquent représente les cellules isolées dans la boîte du panneau précédent. (A) Les doublets sont éliminés selon la forme. (B) Les lymphocytes sont sélectionnés selon leur forme. (C) Les cellules mortes sont exclues par le marqueur 7AAD. (D) Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont sélectionnées selon leur expression des marqueurs CD3 et CD4. (E) Les cellules ayant été marquées à la CFSE sont sélectionnées. (F) La dilution de la fluorescence de la CFSE est visualisée contre l’expression de CD4.

sont CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sont sélectionnées par leur marquage original VPD450 ou CFSE pour distinguer quelle population est étudiée. Pour chacune de ces populations, la prolifération est mesurée comme une décroissance de fluorescence dans leur marqueur respectif (Figure 16).

Avec ce modèle, lorsque les CD4<sup>+</sup> ont été incubées avec des mDC et sans MSC, puis qu’elles sont transférées à une nouvelle MLR, ces cellules n’ont pas de propriétés suppressives. Comme il est possible d’observer dans notre nouveau système de mesure avec marqueurs fluorescents, dans les conditions avec ou sans MSC, les cellules transférées déjà stimulées prolifèrent à un haut niveau (Figure 17A), alors que les cellules répondeuses ne prolifèrent pas (Figure 17C). Cependant, les cellules transférées et répondeuses sont capables de proliférer de façon similaire lorsque les cellules transférées n’ont pas été stimulées auparavant (Figure 17B).

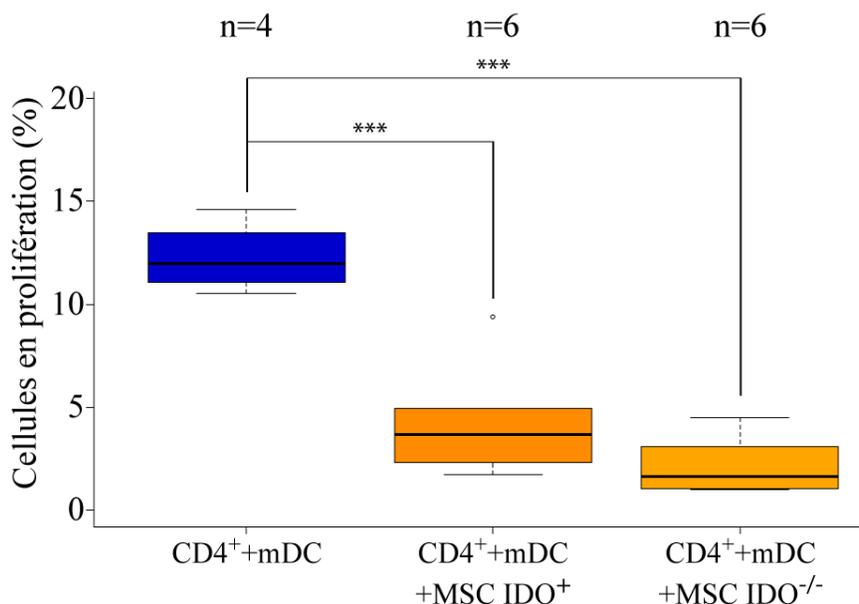
Ce modèle est donc différent du modèle précédemment utilisé; l'utilisation de la CFSE permet d'avoir une autre vision de la réaction en cours.



**Figure 17 – Transfert de cellules**

Les cellules sont transférées d'une réaction leucocytaire mixte (MLR) dans une seconde MLR avec des cellules répondeuses et des cellules stimulatrices. Les conditions représentent les cellules présentes dans la MLR primaire. (A) Les cellules transférées sont marquées avec le colorant VPD450 et la proportion de ces cellules en prolifération est calculée. (B) Les cellules CD4<sup>+</sup> mises en culture seules ont été marquées à la VPD450 (violet) et transférées avec des cellules répondeuses CFSE<sup>+</sup> (orangé) et des cellules dendritiques matures (mDC), puis incubées pendant 4 jours. (C) Les cellules CD4<sup>+</sup> mises en culture avec des mDC allogéniques ont été marquées à la VPD450 (violet) et transférées avec des cellules répondeuses CFSE<sup>+</sup> (orangé) et des mDC, puis incubées pendant 4 jours.

### 3.7 Irradiation des cellules transférées



**Figure 18 – Irradiation des cellules transférées**

Les cellules sont irradiées à 25 Gy et transférées d'une réaction leucocytaire mixte (MLR) dans une seconde MLR avec des cellules répondeuses et des cellules stimulatrices. Les conditions représentent les cellules présentes dans la MLR primaire. Les cellules répondeuses sont marquées avec le colorant CFSE et la proportion de ces cellules en prolifération est calculée.

Les cellules transférées ont déjà été en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes et sont donc préparées à proliférer. Leur prolifération est avantagée, au point d'entraîner un épuisement du milieu, ce qui bloque les cellules répondeuses. Nous avons supposé que c'était la prolifération importante des cellules transférées et non un effet modulateur spécifique qui prévenait l'activation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté de limiter l'impact des cellules transférées en les soumettant à une irradiation de 25 Gy. Avec l'ajout de l'irradiation dans le protocole de transfert de cellules, on observe que les cellules répondeuses prolifèrent en culture avec des cellules cultivées en absence de MSC, mais que la présence de MSC permet aux cellules transférées d'inhiber les cellules répondeuses, même lorsqu'elles sont irradiées (Figure 18). Les cellules qui n'ont pas eu de contact avec les MSC permettent la prolifération de cellules répondeuses, peu importe leur état prolifératif. Les cellules en prolifération montrent une tendance à limiter légèrement la prolifération. Par contre, les cellules ayant été avec des MSC durant les 6 jours de la réaction primaire bloquent la prolifération des cellules répondeuses. En moyenne, l'inhibition relative au nombre de cellules

en prolifération maximal se situe à environ 35% avec des cellules ayant été en contact avec des MSC.

L'induction de ces cellules inhibitrices dans la MLR n'est en revanche pas dépendante de l'enzyme IDO1. Les MSC IDO<sup>-/-</sup> ont un effet inhibiteur similaire aux cellules normales dans les expériences de transfert (Figure 18), bien que les cellules CD4<sup>+</sup> en contact avec les cellules MSC prolifèrent.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Validation du modèle

La première nécessité du projet était de montrer la pertinence du modèle. Il est connu que les lymphocytes T sont les acteurs principaux de la GvHD. Ces derniers se retrouvent activés par les cytokines résultantes du conditionnement et par les APC du patient. Les lymphocytes T prolifèrent alors et provoquent des dégâts cellulaires importants dans les organes cibles. Ces dommages sont causés par les cytokines et les médiateurs cytotoxiques relâchés. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4<sup>+</sup>) sont les orchestrateurs principaux de la réponse adaptative. Les lymphocytes B requièrent l'interaction avec les cellules T auxiliaires afin de produire les anticorps (97). Similairement, les lymphocytes cytotoxiques sont capables de réagir aux signaux des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (98). Dans un modèle pré-clinique de GvHD, notre équipe a démontré une réponse préférentielle des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (91). De plus, les MSC semblent avoir plus d'effets sur la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> que sur les cellules CD8<sup>+</sup> (99). Afin de poursuivre les études dans ce modèle, nous avons plus particulièrement étudié l'effet des MSC sur les cellules T CD4<sup>+</sup>.

Afin d'étudier plus en détail l'action des MSC sur les lymphocytes auxiliaires, nous avons simplifié la réaction MLR qui consiste à mélanger des leucocytes totaux allogéniques pour observer la prolifération. Nous avons alors purifié les cellules T CD4<sup>+</sup> d'un donneur sain qui sont nos cellules répondeuses. Pour effectuer la stimulation, nous avons différencié des mDC à partir de monocytes. Dans cette réaction il n'y a donc que la cellule répondeuse et l'APC. Une stimulation faible à un ratio de 40 cellules T contre 1 mDC a été établi pour obtenir une prolifération qui est efficace, mais qui n'est pas fulgurante. En général, après six jours de cette réaction allogénique, le pourcentage de cellules CFSE<sup>FAIBLE</sup>, donc ayant proliféré, se situe aux alentours de 60% (Figure 8A). Il est possible de voir, dans ces conditions, que le modèle de stimulation est fonctionnel et la prolifération est suffisante pour pouvoir observer une décroissance de prolifération.

Pour modéliser l'efficacité modulatrice observée *in vivo* dans certaines études cliniques, nous avons choisi d'ajouter des MSC dans la réaction allogénique à un ratio de 1 MSC pour 10

cellules T. L'irradiation des MSC n'affecte pas leur potentiel d'inhibition du système immunitaire (100). En moyenne, l'inhibition effectuée par les MSC se situe autour de 90% (Figure 8B). Avec ces résultats, nous sommes confiants que nous pouvons étudier les mécanismes qui sont responsables de la modulation des MSC.

Nous avons aussi remarqué que la présence de MSC ou de cellules stimulatrices dans les conditions n'a pas d'impact sur la mort cellulaire ou apoptose. En effet, le pourcentage de cellules marquées à la 7AAD ne varie pas selon les conditions (Figure 8C). Il est difficile de statuer avec certitude sur la possibilité que les MSC provoquent la mort cellulaire des cellules T, puisque les cellules finissent par se briser en débris à la fin du processus d'apoptose. Pour répondre à cette question, il suffirait d'observer l'apoptose en temps réel en microscopie. L'anticorps anti-annexine V couplé à un fluorochrome rends fluorescentes les cellules en apoptose par la liaison de la phosphatidylsérine (101). Il est certain qu'il est improbable que cette expérience nous indiquerait que les MSC induisent la mort des cellules CD4<sup>+</sup>, puisque dans ce cas nous devrions déjà voir une légère augmentation de l'apoptose à la fin de la réaction.

Les MSC diminuent la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup>, mais il est difficile d'établir si le nombre de cellules à entrer en prolifération est diminué ou si le nombre de divisions que chaque cellule effectue est diminué. Cela est dû aux paramètres de la prolifération : les pics de génération ne sont pas différenciables comme lors d'une stimulation de cellules mononucléées sanguines totales par un anticorps anti-CD3 (Figure 7F). L'absence de ces pics marquant chacune des générations de cellules ne permet pas l'analyse par le logiciel utilisé par notre laboratoire. Il est certain que dans d'autres conditions de stimulations plus puissantes (billes couplées aux anticorps stimulateurs, anticorps anti-CD3, phytohémagglutinine, etc) ces pics seraient probablement plus distincts, mais ces conditions de stimulation sont supra-physiologique en force et s'éloignent donc de notre objectif.

Avec ce modèle *in vitro*, il reste encore un certain pas à franchir pour permettre la translation vers la clinique. Les modèles *in vivo* sont plus près de la pathologie humaine en raison des interactions plus complètes avec l'organisme. Notre laboratoire maîtrise un tel modèle de GvHD chez la souris (91). L'utilisation de la co-culture *in vitro* nous permettra d'établir de façon rapide et peu coûteuse des conclusions sur le mécanisme *in vitro* d'action des MSC, mais l'utilisation subséquente du modèle murin viendra confirmer l'importance du

mécanisme identifié dans un modèle plus près de la pathologie humaine. Bien que le modèle *in vivo* soit plus adapté, il pourrait exister des différences avec l'utilisation chez les patients ; il est impossible de prévoir avec une certitude absolue les effets de la translation vers un modèle plus complexe. C'est pourquoi nous avons choisi le modèle que nous croyons le plus adapté pour effectuer nos recherches.

## 4.2 Nature soluble du médiateur

Tout d'abord, nous avons cherché à déterminer la nature du médiateur sécrété par les MSC. Comme les facteurs potentiels se situent dans une classe ou l'autre, cela nous permet d'exclure certains médiateurs. Le transfert de surnageant est une technique simple qui permet d'évaluer facilement l'implication de facteurs solubles. Cette technique comporte des désavantages. Tout d'abord, le milieu peut être partiellement épuisé lors du transfert puisqu'il a déjà servi à cultiver des cellules. Pour contourner ce point, nous avons effectué le transfert avant le début de la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup>. Ces cellules sont les seules à proliférer, car les autres types cellulaires présents ont été irradiés afin d'empêcher leur prolifération. Le second désavantage de la technique est que le surnageant doit contenir suffisamment du facteur soluble puisqu'il doit être dilué afin de permettre l'ajout des cellules dans ce volume. Ce point aussi a été amoindri en mettant en suspension les cellules ajoutées dans un volume minimal. Ainsi 90% du volume de la seconde MLR provient du surnageant transféré. Nous observons que les surnageant provenant des conditions avec MSC ont un certain potentiel inhibiteur (Figure 9A). Lorsque des mDC sont présents, cette inhibition atteint 22% de la valeur des conditions sans MSC. Cette information suggère fortement l'implication d'un médiateur de nature soluble dans l'immunosuppression des MSC. Pour conforter ce résultat, nous avons aussi utilisé un appareillage de type « transwell ». Ce montage comporte deux compartiments superposés et séparés par une membrane perforée de pores de 0,6 µm de diamètre. Cette membrane assure le passage de molécules solubles en suspension, mais ne permet pas aux cellules de passer, même en se déformant. L'avantage de cette méthode est la sécrétion en continu du facteur soluble, au contraire du transfert de surnageant qui ne permet que de voir le médiateur accumulé en solution à un temps donné. Les cellules répondeuses ont été mises en culture au haut du système; la plus petite surface permet d'utiliser un nombre de cellules réduit comparé au bas du système. Dans tous les cas, la présence de MSC a permis de réduire la fraction des cellules en prolifération d'au

moins 55% (Figure 9B). Lorsque les MSC étaient séparées des cellules en stimulation, la prolifération était encore plus inhibée. Il est possible que ce phénomène soit dû à la concentration des cellules; lorsque les cellules sont toutes dans le même compartiment, elles sont en très grande proximité. Au contraire, quand les MSC sont au bas du montage, elles ont plus de place pour s'attacher au plastique. Il est très possible que de telles différences dans la proximité des MSC entre elles et avec d'autres cellules affectent leurs propriétés, puisque plusieurs données présentent des effets de l'environnement physique et chimique sur les propriétés des MSC (102-104).

### **4.3 Inhibition des enzymes COX-1 et COX-2**

La PGE<sub>2</sub> est connue pour induire une tolérance du système immunitaire. La production des prostaglandines en général est dépendante de la première étape dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Cette étape est ciblée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les enzymes COX-1 et COX-2 sont responsables de la transformation de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub>, qui est ultérieurement transformé en PGE<sub>2</sub>. L'anti-inflammatoire IDM bloque l'action des deux isoformes de façon très efficace. Son utilisation pour limiter la sécrétion de tous les dérivés de l'acide arachidonique, dont la PGE<sub>2</sub>, est documentée dans la littérature. Les autres dérivés sont des promoteurs des processus inflammatoires, au contraire de la PGE<sub>2</sub>, ce qui justifie l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens pour réduire l'inflammation chez les patients. Malgré l'inhibition des prostaglandines pro-inflammatoires, la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> stimulées par des mDC n'est pas altérée (Figure 10). Il est possible de conclure que le composé n'affecte pas directement les cellules T ou les mDC dans notre modèle. Les dérivés de l'acide arachidonique n'entrent pas en jeu dans l'activation et l'amplification de cette activation dans le modèle. L'effet inhibiteur des MSC n'est pas abrogé par le composé IDM (Figure 10). Il apparaît donc que la voie du PGE<sub>2</sub> ne semble pas essentielle pour la suppression des réponses T par les MSC. Nous n'avons cependant pas de témoin pour valider l'efficacité du composé IDM. Il est prévu d'utiliser une technique d'immunoabsorption à enzyme liée (ELISA) afin de vérifier l'activité de l'IDM.

## 4.4 Inhibition du lactate

En raison de son utilisation par certains tissus transformés pour atténuer la réponse immunitaire, le lactate est une cible intéressante. Cette molécule est produite par la voie glycolytique, qui est principalement utilisée par les cellules en division rapide. Elle est externalisée et internalisée par les transporteurs de la famille MCT. Des voies en aval ont aussi été identifiées récemment, le récepteur GPR81 et la voie Akt. Afin de tester l'implication du lactate dans la suppression de la réponse proliférative des cellules T par les MSC, ces dernières ont été traitées avec l'OXA avant la MLR. L'OXA est un analogue du pyruvate qui agit de façon non compétitive pour bloquer les enzymes LDH. L'utilisation de l'OXA dans la MLR semble empêcher l'inhibition médiée par les MSC (Figure 11). Cependant, l'écart entre les valeurs est très élevé. Nous supposons que cette variabilité est due à une marge étroite d'efficacité de l'inhibiteur OXA et à une instabilité du produit en culture. En effet, les cellules présentent une hétérogénéité dans la réponse à l'OXA. Cette variabilité nous empêche de conclure avec certitude sur l'implication du lactate dans notre modèle. Nous voulons utiliser la technique de CRISPR pour éliminer les gènes LDH des MSC et ainsi contourner l'utilisation d'inhibiteurs chimiques. Bien que la voie du lactate soit très importante, nous croyons qu'il est possible d'obtenir des cellules déficientes en LDH, puisque les patients n'ayant pas le gène LDHA ou LDHB survivent (105, 106). Il semblerait donc qu'une mutation dans ces gènes ne soit pas létal.

## 4.5 Inhibition de l'enzyme IDO1

L'enzyme IDO1 est un médiateur d'immunomodulation très étudié chez les MSC et chez d'autres types cellulaires. Malgré ces études aucun consensus n'a été atteint sur l'importance de cette enzyme. Son fonctionnement réside dans sa fonction enzymatique; le tryptophane est transformé en dérivés kynuréniques, apparentés au composé éponyme kynurénine. À la fois la déplétion de l'acide aminé tryptophane et la production de kynurénines pourraient agir sur les cellules T pour abolir leur prolifération. Pour tenter d'abolir l'activité de l'enzyme, nous avons utilisé le composé 1-MT qui est très utilisé dans la littérature pour bloquer IDO1. Nous avons remarqué que le composé 1-MT était lui-même nocif pour la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Figure 12A). Ce résultat est surprenant, mais peut être expliqué par une action du 1-MT sur la balance intracellulaire de tryptophane. Le 1-MT, sur des cellules cancéreuses, a été

démontré comme un promoteur de l'efflux du tryptophane (107). Cet effet a été démontré sur un des deux systèmes de transport du tryptophane, le même système de transport présent sur les lymphocytes T (108). Aussi, le 1-MT, malgré son fort effet sur la prolifération des lymphocytes T, est incapable de bloquer complètement la production de kynurénines par les MSC (Figure 12B). Les MSC sécrètent probablement une quantité trop importante de l'enzyme IDO1 pour la concentration de 1-MT utilisée.

Comme les inhibiteurs chimiques peuvent avoir des effets secondaires indésirés, nous avons utilisé une inhibition par les acides nucléiques. Des lentivirus exprimant un ARN interférant de type shARN ont été achetés et ont servi à infecter des MSC. Les shIDO sont dirigés contre l'ARN messager produit par le gène de l'IDO1. En parallèle, des MSC de la même source ont été infectées avec un shARN n'ayant pas de cible dans le transcriptome humain (shSCR). Dans notre modèle de stimulation, les cellules shIDO avaient un effet d'inhibition de la prolifération des CD4<sup>+</sup> identique aux cellules exprimant un shARN non spécifique ou aux cellules originales (Figure 13A), pouvant laisser suggérer que l'IDO1 n'était pas en cause. L'efficacité de la diminution a été vérifiée. Après une stimulation à l'IFN $\gamma$  les MSC sécrètent l'enzyme IDO1 et le shIDO diminue cette sécrétion. La diminution a été estimée de façon semi-quantitative; l'utilisation du shIDO a permis de diminuer d'environ de moitié la quantité d'enzyme sécrétée en réponse à l'IFN $\gamma$  (Figure 13B). Ce résultat a été validé par la mesure des dérivés kynuréniques dans le surnageant de la MLR. Les niveaux étaient aussi élevés dans les conditions où des MSC avec ARN interférant étaient utilisées qu'avec des MSC non modifiées (Figure 13C). Selon ces résultats, une simple diminution de la capacité d'IDO1 n'est pas efficace pour affecter l'effet fonctionnel d'IDO1.

Pour complètement abolir l'expression de l'enzyme IDO1 nous nous sommes tournés vers le système CRISPR/Cas. Un sgARN a été conçu pour se lier à la région codante immédiatement en 5' d'IDO1 avec un PAM adjacent à la région d'appariement (sgIDO). L'outil E-CRISP a été utilisé pour la conception de cette séquence. Après l'insertion de la Cas9, puis du sgIDO, une partie des cellules a été stimulée avec l'IFN $\gamma$  et la production de kynurénines a été mesurée dans le surnageant. Une courbe de production a été établie, en mesurant la concentration de kynurénines accumulées à certains temps, afin d'établir la dynamique de production et déterminer le moment idéal de mesure pour distinguer le niveau de production des

clones (Figure 14A). Ce temps a été déterminé comme étant 48 heures puisque les cellules non modifiées avaient atteint leur plateau. Huit clones ont été établis par dilution et ont été criblés par la mesure des kynurénines en réponse à l'IFN $\gamma$ . Les clones ont été nommés de c1 à c8. Parmi ces huit clones, les clones c1, c2, c4 et c7 sont déficients en activité de l'enzyme IDO1, tel que mesuré par la technique spectrophotométrique sur du surnageant récolté à 48 heures après stimulation aux interférons (Figure 14B). Les clones c1 à c4 ont également été vérifiés par western blot pour confirmer l'absence d'IDO1 dans les clones qui ne produisent plus de kynurénines (Figure 14C). Afin de respecter l'hétérogénéité de la population initiale, les trois clones confirmés comme étant IDO $^{-/-}$ , les clones c1, c2 et c4, ont été utilisés dans les expériences. Un seul clone IDO $^{+}$ , le c3, a été utilisé en tant que témoin. Lorsqu'ils sont utilisés dans la MLR les cellules IDO $^{-/-}$  ne peuvent plus limiter la prolifération des cellules CD4 $^{+}$  autant que des cellules IDO $^{+}$  (Figure 15). Ces résultats montrent que l'enzyme IDO1 est importante dans la modulation des lymphocytes auxiliaires par les MSC.

L'identification de IDO1 comme médiateur de la suppression des cellules CD4 $^{+}$  par les MSC pourrait avoir un impact sur leur utilisation en clinique. L'hétérogénéité des MSC issus de différentes sources et de différents donneurs cause une hétérogénéité dans l'effet clinique observé. En effet, IDO1 pourrait servir de marqueur prédictif de l'efficacité des MSC lors de la sélection à la fois des donneurs et de la source. De plus, certains ont avancé le concept de pré-stimulation des MSC afin d'augmenter leur potentiel immunomodulateur (60). Par exemple, la stimulation avec l'IFN $\gamma$ , comme lors d'un contexte inflammatoire, permet aux MSC d'exprimer l'enzyme IDO1. En exposant les MSC à l'IFN $\gamma$  avant leur infusion, ces derniers pourraient agir plus rapidement sur l'inhibition des cellules CD4 $^{+}$  et contrôler l'immunopathologie de la GvHD plus rapidement. Par contre, il est possible que cette étape d'activation, nécessaire à la production d'IDO1, explique que les MSC ne provoquent pas les effets secondaires observés lors des traitements classiques de la GvHD. Ainsi, les MSC peuvent inhiber l'activité des lymphocytes en présence de hauts niveaux d'IFN $\gamma$  comme lors de l'exacerbation de la GvHD, mais restent tolérants à l'activation des cellules T dans des contextes moins extrêmes, comme lors d'une réponse à un agent pathogène. L'activation des TLR pourrait aussi expliquer cette observation. Ces récepteurs peuvent être activés chez les MSC (60). Les MSC pourraient donc agir différemment dans les situations d'infection comparativement à la GvHD ou à une maladie

auto-immune. Cette capacité de différenciation n'est pas possible avec les traitements pharmacologiques.

Il est à noter toutefois que la prolifération intégrale n'est pas restaurée, ce qui laisse supposer qu'un ou plusieurs autres médiateurs pourraient aussi entrer en jeu. Le lactate est une molécule qui pourrait aussi entrer en jeu à ce niveau et que nous continuerons à étudier. Les outils que nous avons utilisés ne nous ont pas permis de déterminer avec certitude que ce métabolite est impliqué dans notre modèle, mais certaines tumeurs l'utilisent pour diminuer les réponses immunitaires. Nous sommes dans le processus pour créer un outil CRISPR pour cibler les gènes LDHA et LDHB. Nous croyons que cet outil nous permettra de répondre à cette question. Aussi, HLA-G pourrait être un effecteur dans l'inhibition des lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Un anticorps pourra servir à vérifier la présence de ce marqueur. En fonction de ce résultat, nous déciderons d'utiliser similairement la technique CRISPR. Si ces deux approches n'identifient pas le ou les effecteurs de l'inhibition, nous recourons à la librairie CRISPR à notre disposition pour cibler près de 30000 gènes. Des clones seront établis et des clones dont l'habileté à supprimer la réponse T est diminuée seront identifiés. La cible de la modification génomique sera alors identifiée par séquençage du sgRNA.

#### **4.6 Validation de la technique de transfert**

Les MSC, lorsqu'injectées *in vivo*, ne sont plus retrouvées après une courte période, bien que leurs effets soient retrouvés à plus long terme (109, 110). Cette différence de durée est difficile à expliquer. Nous avons précédemment remarqué que les cellules CD4<sup>+</sup>, lorsqu'elles sont co-cultivées avec des MSC, acquièrent une capacité à moduler la réponse proliférative d'autres cellules CD4<sup>+</sup> autologues (93). La thymidine tritiée est typiquement utilisée, mais présente plusieurs inconvénients et limites. Il a donc fallu mettre au point la technique de transfert, qui permet de mesurer la capacité inhibitrice des lymphocytes T auxiliaires, avec des marqueurs fluorescents de prolifération. En plus de la CFSE, dont l'utilisation est très répandue, nous avons utilisé le VPD450. Ce marqueur a été choisi parce qu'il se fixe aux composants cellulaires de façon analogue à la CFSE. De plus, ce colorant est excité et émet dans des longueurs d'onde différentes, ce qui permet d'éviter les problèmes de compensation lors de

l'acquisition. Le marquage différentiel des deux populations de cellules T permet de distinguer lesquelles prolifèrent.

Lorsque nous avons fait le transfert de cellules incubées avec des mDC avec ou sans MSC durant six jours, nous avons remarqué que les cellules qui prolifèrent sont les cellules transférées (Figure 17A). Les cellules répondeuses peuvent proliférer lorsque les cellules transférées n'ont pas été stimulées avant le transfert (Figure 17B). Cependant, les cellules stimulées par les mDC transférées, qui prolifèrent à un haut niveau, empêchent la prolifération des cellules répondeuses (Figure 17C). Ce résultat est inattendu, puisque seulement les cellules ayant été en contact avec les MSC devraient être inhibitrices. Notre hypothèse est que les cellules ayant déjà été stimulées par des mDC sont plus propices à proliférer et le font plus rapidement. Cette prolifération exagérée épuise rapidement le milieu de culture, ce qui empêche les cellules répondeuses plus lentes de proliférer. Il s'agit plus probablement d'un effet secondaire dû à une compétition pour les nutriments disponibles.

#### **4.7 Irradiation des cellules transférées**

Pour contrer les effets collatéraux dus à la prolifération des cellules transférées, plusieurs solutions ont été envisagées. Les cellules auraient pu être incubées sans source de stimulation pour leur permettre de reposer. Par contre, comme il s'agit de cellules primaires, elles ne peuvent pas se garder en culture pour de longues périodes de temps. Le temps total d'incubation est déjà de six jours avant le transfert. Une autre solution aurait été de diminuer le ratio de cellules transférées par rapport aux cellules répondeuses. Le nombre de cellules en prolifération aurait été moindre et conséquemment l'effet d'épuisement des nutriments en aurait été diminué. Dans cette technique cependant, les cellules suppressives sont aussi diminuées. Ce point est particulièrement crucial étant donné que ces cellules ne représentent probablement qu'une fraction restreinte des cellules transférées.

Nous avons plutôt opté pour une irradiation des cellules transférées. Cela nous permet de ne pas diluer ces cellules et de ne pas avoir à les garder trop longtemps en culture. Nous savons que ces cellules transférées ne sont pas enrichies en cellules Treg (93, 111). Elles seraient plutôt  $IL-10^+ IFN\gamma^+$  comme phénotype (93). Cette considération est importante puisqu'il est connu que les lymphocytes Treg sont sensibles aux radiations et leur potentiel suppresseur est

modifié après un tel traitement (112). Il a été montré toutefois que certaines autres cellules immunosuppressives issues des leucocytes continuaient d'exercer un effet inhibiteur, même après avoir été irradiées (113). Nous avons donc utilisé la même dose de 25 Gy.

Avant l'irradiation, les cellules transférées sont passées sur une nouvelle plaque à fond plat. Les cellules sont incubées pour que les MSC, qui sont adhérentes, s'attachent au fond de la plaque. Ces cellules restent normalement attachées au fond de la plaque de la MLR, mais un pipetage trop vigoureux peut détacher quelques cellules. Éviter le transport de cellules MSC avec les cellules CD4 est très important, puisque les MSC pourraient fausser les résultats si elles étaient transférées. De plus, une observation visuelle permet d'assurer l'absence de MSC en raison de leur taille distinctive.

Les lymphocytes ayant été incubés sans MSC, donc des CD4<sup>+</sup> incubées avec ou sans mDC, n'effectuent pas de modulation de la prolifération des cellules répondeuses (Figure 18). En revanche, les cellules transférées qui ont été en contact avec les MSC durant l'incubation de 6 jours diminuent la réponse proliférative des CD4<sup>+</sup> dans la nouvelle MLR. Lorsque que des mDC étaient présents durant la première réaction, l'inhibition est plus marquée comparé à des cellules transférées qui ont simplement été en contact avec des MSC. Dans les cellules transférées, il est supposé qu'une fraction des cellules contribue à l'effet suppresseur. Bien que la prolifération ne soit pas nulle lors de la MLR primaire, cette prolifération n'est pas suffisante pour permettre une amplification du nombre de cellules inhibitrices. Cet effet d'amplification du potentiel immunomodulateur pourrait donc être dû à deux phénomènes. Il pourrait s'agir d'une augmentation de la puissance de cette fraction de cellules, ou encore d'une augmentation du nombre de cellules rendues fonctionnellement suppressives dans la population transférée. De plus, l'effet pourrait être direct, soit médié directement par les mDC en rendant les cellules CD4<sup>+</sup> plus sensibles au mécanisme déployé par les MSC, ou indirect, soit médié par une sécrétion de facteurs par les cellules T qui activent les MSC d'avantage.

L'identité des lymphocytes, bien que certains types de cellules suppressives aient été écartés, n'a pas été identifié. Les cellules Treg sont le type de cellules T inhibitrices le plus courant. Cependant, ce type de cellule a été démontré comme susceptible aux radiations gamma qui abolissent leur effet (112). Comme les cellules que nous transférons sont irradiées et qu'elles agissent encore sur des cellules CD4<sup>+</sup> autologues, il ne peut s'agir de cellules Treg. De plus,

notre équipe a précédemment démontré que les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tregs) ne sont pas enrichies dans ce modèle. Ces deux informations nous suggèrent que l'identité des cellules suppressives engendrées est différente des Tregs. Ces cellules pourraient être des cellules de type Tr1. Ces cellules ont été décrites comme exprimant l'IL-10, le TGF-β, l'IFN-γ, IL-5 et n'exprimant pas l'IL-4, l'IL-2 et FoxP3. Elles sont d'autant plus intéressantes que des cellules semblables selon le profil de cytokines ont été décrites dans certains cas de transplantation (114).

Il a aussi été déterminé que l'enzyme IDO1 n'est pas responsable de l'induction de CD4<sup>+</sup> inhibiteurs par les MSC (Figure 18). Bien qu'en absence de sécrétion d'IDO1 par les MSC, les cellules CD4<sup>+</sup> prolifèrent à un niveau similaire à des CD4<sup>+</sup> stimulées par des mDC, ces cellules ont acquis un potentiel inhibiteur. Il semble alors que les mécanismes utilisés par les MSC pour arrêter la prolifération des cellules CD4<sup>+</sup> et pour induire leur différenciation en cellules suppressives soient différents. La molécule du HLA-G pourrait, si elle est exprimée par les MSC, être le signal qui permet aux MSC d'induire les T suppresseurs. Dans certains cas des antigènes peuvent être transmis de la surface d'une cellule à une autre. Il semblerait que des cellules malignes soient capable de transmettre le HLA-G aux lymphocytes T, qui adoptent alors un comportement tolérogénique (115).

Il y a plusieurs mécanismes impliqués dans la fonction des cellules Tr1. La sécrétion d'IL-10 et l'expression des molécules CTLA-4 et PD-1 pourraient être impliqués dans l'effet des cellules CD4<sup>+</sup> suppressives induites dans notre modèle. La transduction des cellules T est assez facile à effectuer. Dans cette optique, il sera intéressant d'introduire des mutations dans ces gènes à l'aide de la technique CRISPR pour empêcher leur production.

Ces résultats permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action des MSC sur les cellules T. Il sera intéressant de transposer ces résultats *in vivo*, dans le modèle murin de GvHD maîtrisé par notre laboratoire. Il est certain que les MSC ont des effets sur d'autres cellules immunitaires que nous pourrions mieux observer *in vivo*, mais nous croyons que les effets sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> seront importants.

## 5. PERSPECTIVES

Les résultats issus de ma maîtrise permettent d'enrichir les connaissances sur le fonctionnement de l'immunosuppression effectuée par les MSC. Ces résultats serviront de base pour la continuité du projet, dans lequel nous tenterons de définir les acteurs encore inconnus dans notre modèle de GvHD *in vitro*. D'abord, en utilisant une banque de gARN pour le criblage à haut débit, nous voulons identifier le ou les autres médiateurs qui permettent aux MSC de limiter la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une des cibles que nous visons à étudier plus en détail est l'implication du lactate, puisque les inhibiteurs chimiques utilisés ne nous ont pas permis de déterminer de porter de conclusion sur l'implication de ce métabolite dans notre système. Ensuite, avec un criblage par la même méthode, nous étudierons les facteurs intermédiaires dans la génération des cellules CD4<sup>+</sup> inhibitrices. Nous avons déterminé qu'IDO n'est pas responsable de l'induction de T suppresseurs, mais le médiateur qui les induit reste à identifier. Nous allons aussi nous pencher sur une caractérisation exhaustive des cellules T modifiées par les MSC. Des informations nous permettent de stipuler que les cellules suppressives ne sont pas des Treg. C'est cellules pourraient être de type Tr1. Cette caractérisation sera effectuée par cytométrie en flux et par criblage des ARN messagers. Finalement, des études *in vivo* dans un modèle murin déjà mis en place au laboratoire permettront d'appliquer les découvertes effectuées dans un contexte plus près de l'utilisation clinique.

## 6. CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que les MSC ont un fort potentiel immunosuppresseur sur les cellules T CD4<sup>+</sup>, selon le modèle que nous avons établi. Cette suppression des lymphocytes CD4<sup>+</sup> est dépendante de facteurs solubles, tel que déterminé par le transfert de surnageant et par co-incubation sans contact. Le facteur soluble principalement impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> a été identifié comme étant l'enzyme IDO1, puisque des MSC perdant l'expression de cette protéine perdent une majeure partie de leur potentiel inhibiteur dans notre modèle. D'autres facteurs secondaires pourraient aussi jouer un rôle dans cette suppression, étant donné que la prolifération maximale n'est pas récupérée en absence d'IDO1. Par exemple, le lactate semble avoir un effet sur les MSC, mais les outils utilisés ici ne permettent pas de conclure avec certitude.

Les MSC sont de plus capables d'induire une modification des cellules CD4<sup>+</sup>, ce qui rend ces dernières aptes à limiter la prolifération d'autres lymphocytes autologues. Ces cellules ne sont pas des Treg, et ne semblent pas correspondre à la définition des cellules Tr1. Ce changement des lymphocytes CD4<sup>+</sup> est indépendant de l'enzyme IDO1 chez les MSC, car des MSC IDO<sup>-/-</sup> sont capables d'induire des cellules T suppressives après une coculture. Nous avons aussi déterminé que le potentiel suppresseur des cellules CD4<sup>+</sup> ne requiert pas la prolifération de ces cellules inhibitrices et que leur irradiation préserve ce potentiel. Plus de recherches sont requises pour identifier le ou les facteurs impliqués dans l'induction des cellules T inhibitrices par les MSC et dans leur mécanisme de suppression des réponses prolifératives. L'utilisation d'un modèle murin permettrait aussi d'améliorer notre compréhension de la dynamique en jeu.

## Bibliographie

1. Thomas DE, Jr HL, Lu W, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257(11):491-6.
2. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute GVHD: a bench to bedside update. *Blood.* 2014.
3. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Kawamata T, Tojo A, et al. Comparable Long-Term Outcome of Unrelated Cord Blood Transplantation with Related Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Patients Aged 45 Years or Older with Hematologic Malignancies after Myeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(8):1150-5.
4. Jagasia M, Arora M, Flowers MED, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, et al. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2012;119(1):296-307.
5. Sung AD, Chao NJ. Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(1):25-32.
6. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood.* 2005;106(4):1495-500.
7. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-Marrow Transplantation. *N Engl J Med.* 1975;292(17):895-902.
8. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol.* 1997;97(4):855-64.
9. Xhaard A, Rocha V, Bueno B, de Latour RP, Lenglet J, Petropoulou A, et al. Steroid-Refractory Acute GVHD: Lack of Long-Term Improved Survival Using New Generation Anticytokine Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(3):406-13.
10. Lee SJ, Flowers ME. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:134-41.
11. Duarte RF, Greinix H, Rabin B, Mitchell SA, Basak G, Wolff D, et al. Uptake and use of recommendations for the diagnosis, severity scoring and management of chronic GVHD: an international survey of the EBMT-NCI Chronic GVHD Task Force. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):49-54.
12. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood.* 2014;124(3):344-53.
13. Kittan NA, Hildebrandt GC. The Chemokine System: A Possible Therapeutic Target in Acute Graft Versus Host Disease. In: Bruserud O, Kittang AO, editors. *The chemokine system in experimental and clinical hematology.* Curr Top Microbiol Immunol. 3412010. p. 3-12.
14. Malard F, Milpied N, Blaise D, Chevallier P, Michallet M, Lioure B, et al. Effect of graft source on unrelated donor hemopoietic stem cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia after reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning: a study from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21(6):1059-67.

15. Wassmuth R. Primer on the HLA system. Heidelberg: Ecomed Medizin; 2010.
16. Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(12):942-53.
17. Takahashi H, Furukawa T, Hashimoto S, Suzuki N, Kuroha T, Yamazaki F, et al. Contribution of TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26(12):1317-23.
18. Petersdorf EW. Genetics of graft-versus-host disease: the major histocompatibility complex. *Blood Rev.* 2013;27(1):1-12.
19. Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG. IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens.* 2000;55(3):280-7.
20. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D423-31.
21. Martin PJ. Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant.* 1991;8(3).
22. Goulmy ELS, Schipper R, Pool J. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow .... *N Engl J Med.* 1996.
23. Goulmy E. Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev.* 1997.
24. Counce S, Smith P, Barth R, Snell GD. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann Surg.* 1956;144(2):198.
25. Perreault C, Decary F, Brochu S, Gyger M, Belanger R. Minor histocompatibility antigens. *Blood.* 1990.
26. Spierings E, Kim YH, Hendriks M, Borst E, Sergeant R, Canossi A, et al. 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.* 2013;19(8):1244-53.
27. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2012.
28. Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010.
29. Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant.* 2013;3(4):99-112.
30. Toubai T, Tawara I, Sun Y, Liu C, Nieves E, Evers R. Induction of acute GVHD by sex-mismatched HY antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood.* 2012.
31. Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010:1309-14.

32. Deeg HJ, Sandmaier BM. Who is fit for allogeneic transplantation? *Blood*. 2010;116(23):4762-70.
33. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers ME, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;102(2):756-62.
34. Riddell SR, Appelbaum FR. Graft-versus-host disease: a surge of developments. *PLoS Med*. 2007;4(7):e198.
35. Ruutu T, van Biezen A, Hertenstein B, Henseler A, Garderet L, Passweg J, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD after allogeneic haematopoietic SCT: a survey of centre strategies by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(11):1459-64.
36. Sweetman SC. *Martindale : the complete drug reference*. London; Chicago: Pharmaceutical Press; 2009.
37. Barrett KE, Boitano S, Barman SM, Brooks HL. Chapter 3. Immunity, Infection, & Inflammation. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2012.
38. Gummert JF, Barten MJ, Sherwood SW, Van Gelder T, Morris RE. Pharmacodynamics of immunosuppression by mycophenolic acid: Inhibition of both lymphocyte proliferation and activation correlates with pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(3):1100-12.
39. Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other Effects of Mycophenolic Acid and an Ester Prodrug, Mycophenolate Mofetil. *Immunol Rev*. 1993;136(1):5-28.
40. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-94.
41. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and Second-Line Systemic Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: Recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1150-63.
42. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
43. Xiao Y, Chen J. Proteomics Approaches in the Identification of Molecular Signatures of Mesenchymal Stem Cells. In: Weyand B, Dominici M, Hass R, Jacobs R, Kasper C, editors. *Mesenchymal Stem Cells: Basics and Clinical Application I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1 ed: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 153-76.
44. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*. 6982011. p. 3-8.
45. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
46. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):625-34.
47. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-7.
48. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.

49. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-45.
50. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
51. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102(4):1548-9.
52. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. 1999;65(1):22-6.
53. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
54. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
55. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*. 2007;16(4):597-604.
56. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129(1):118-29.
57. Gotherstrom C, Ringden O, Westgren M, Tammik C, Le Blanc K. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(3):265-72.
58. Bieback K, Kern S, Kocaoomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng*. 2008;18(1 Suppl):S71-6.
59. Battula VL, Treml S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*. 2009;94(2):173-84.
60. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
61. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, Melamed E, Offen D. Differentiated Mesenchymal Stem Cells for Sciatic Nerve Injury. *Stem Cell Rev*. 2011;7(3):664-71.
62. Azari MF, Mathias L, Ozturk E, Cram DS, Boyd RL, Petratos S. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of CNS Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8(4):316-23.
63. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JAM, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and Safety of Ex Vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal™) in Pediatric Patients with Severe Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease in a Compassionate Use Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(4):534-41.
64. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*. 2013;19(1):35-42.

65. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(1):19-26.
66. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol.* 2015;6.
67. Grohmann U, Puccetti P. The Coevolution of IDO1 and AhR in the Emergence of Regulatory T Cells in Mammals. *Front Immunol.* 2015;6.
68. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol.* 2002;168(8):3771-6.
69. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology.* 2002;107(4):452-60.
70. Stone TW, Stoy N, Darlington LG. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(2):136-43.
71. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3190-8.
72. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol.* 2012;42(8):1932-7.
73. Nguyen NT, Nakahama T, Le DH, Van Son L, Chu HH, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. *Front Immunol.* 2014;5:551.
74. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol.* 2012;188(1):21-8.
75. Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, Ameneiros-Rodríguez E, Donapetry-García C, Vila-Altesor M, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion.* 2014;17:76-100.
76. Zinkham WH, Blanco A, Clowry LJ. An unusual isozyme of lactate dehydrogenase in mature testes: localization, ontogeny, and kinetic properties. *Ann N Y Acad Sci.* 1964;121(2):571-88.
77. Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3685-92.
78. Hirschhaeuser F, Sattler UGA, Mueller-Klieser W. Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Res.* 2011;71(22):6921-5.
79. Cai TQ, Ren N, Jin L, Cheng K, Kash S, Chen R, et al. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;377(3):987-91.
80. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5):2013-21.
81. Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology.* 2014;146(7):1763-74.
82. Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol.* 2013;191(3):1486-95.
83. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007;109(9):3812-9.

84. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33.
85. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie.* 2015;117:119-28.
86. Wei Y, Terns RM, Terns MP. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. *Genes Dev.* 2015;29(4):356-61.
87. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
88. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature methods.* 2014;11(2):122-3.
89. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
90. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotech.* 2015;33(5):543-8.
91. Gregoire-Gauthier J, Selleri S. Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev.* 2011.
92. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer res.* 2014.
93. Selleri S, Dieng MM, Nicoletti S, Louis I. Cord-blood-derived mesenchymal stromal cells downmodulate CD4+ T-cell activation by inducing IL-10-producing Th1 cells. *Stem Cells Dev.* 2012.
94. Flechner ER, Freudenthal PS, Kaplan G, Steinman RM. Antigen-specific T lymphocytes efficiently cluster with dendritic cells in the human primary mixed-leukocyte reaction. *Cell Immunol.* 1988;111(1):183-95.
95. Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A.* 2011;79(2):95-101.
96. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.
97. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology.* New York: Garland Science; 2012.
98. Romagnoli PA, Premenko-Lanier MF, Loria GD, Altman JD. CD8 T Cell Memory Recall Is Enhanced by Novel Direct Interactions with CD4 T Cells Enabled by MHC Class II Transferred from APCs. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e56999.
99. Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(2):333-48.
100. de Andrade AV, Riewaldt J, Wehner R, Schmitz M, Odendahl M, Bornhauser M, et al. Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2014.

101. Dumont EA, Reutelingsperger CPM, Smits JFM, Daemen MJAP, Doevendans PAF, Wellens HJJ, et al. Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart. *Nat Med.* 2001;7(12):1352-5.
102. Li Y, Guo G, Li L, Chen F, Bao J, Shi YJ, et al. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res.* 2015;360(2):297-307.
103. Nava MM, Raimondi MT, Credi C, De Marco C, Turri S, Cerullo G, et al. Interactions between structural and chemical biomimeticism in synthetic stem cell niches. *Biomed Mater.* 2015;10(1):015012.
104. Kalbacova M, Broz A, Kong J, Kalbac M. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon N Y.* 2010;48(15):4323-9.
105. Kanno T, Maekawa M. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiencies: clinical features, metabolic background, and genetic heterogeneities. *Muscle & nerve Supplement.* 1995;3:S54-60.
106. Wakabayashi H, Tsuchiya M, Yoshino K, Kaku K, Shigei H. Hereditary deficiency of lactate dehydrogenase H-subunit. *Internal medicine (Tokyo, Japan).* 1996;35(7):550-4.
107. Travers MT, Gow IF, Barber MC, Thomson J, Shennan DB. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and l-tryptophan transport in human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1661(1):106-12.
108. Seymour RL, Ganapathy V, Mellor AL, Munn DH. A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1320-7.
109. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp F, Geissler E, Schlitt H, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3.
110. Gholamrezanezhad A, Mirpour S, Bagheri M, Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Abdolazadeh L, et al. In vivo tracking of <sup>111</sup>In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol.* 2011;38(7):961-7.
111. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica.* 2007;92(7):881-8.
112. Cao M, Cabrera R, Xu Y, Liu C, Nelson D. Gamma irradiation alters the phenotype and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Cell Biol Int.* 2009;33(5):565-71.
113. Le Rond S, Azéma C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to Support the Role of HLA-G5 in Allograft Acceptance through Induction of Immunosuppressive/Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2006;176(5):3266-76.
114. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol.* 2015;12(5):566-71.
115. Brown R, Kabani K, Favaloro J, Yang S, Ho PJ, Gibson J, et al. CD86<sup>+</sup> or HLA-G<sup>+</sup> can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood.* 2012;120(10):2055-63.

## **Annexe A      Stratégie de recherche des études cliniques**

Les bases de données ClinicalTrials.gov et du Système d'enregistrement international des essais cliniques (ICTRP) ont été interrogées avec les termes « "mesenchymal stromal cell" OR "mesenchymal stem cell" » pour retrouver toutes les études cliniques concernant ces cellules; les recherches ont dénombré 549 et 211 résultats respectivement. Afin d'éliminer les doublons, les résultats ont été exportés dans un fichier XML et un script R a été utilisé pour effectuer le tri. Suite à ce tri, 399 résultats étaient retrouvés uniquement sur ClinicalTrials.gov, 61 seulement sur la base de données de l'ICTRP et 150 étaient partagées.

Les bases de données ClinicalTrials.gov et de l'CTRIP ont été interrogées avec les termes « mesenchymal stem cell AND GvHD OR mesenchymal stem cell AND GVHD OR mesenchymal stromal cell AND GvHD OR mesenchymal stromal cell AND GVHD » pour retrouver toutes les études cliniques concernant ces cellules et la GvHD; les recherches ont dénombré 48 et 14 résultats respectivement. Afin d'éliminer les doublons, les résultats ont été exportés dans un fichier XML et un script R a été utilisé pour effectuer le tri. Suite à ce tri, 37 résultats étaient retrouvés uniquement sur ClinicalTrials.gov, 3 seulement sur la base de données de l'ICTRP et 11 étaient partagées.

## **Annexe B Solutions pour le Western Blot**

### **Tampon RIPA**

1% NP40  
0.1% Déoxycholate de sodium  
0.1% SDS  
150 mM NaCl  
50 mM Tris HCl pH8.0  
1 mM EDTA

### **Gel d'acrylamide 12%**

#### *Gel de migration*

2 ml acrylamide/Bis 29:1 30%  
1.25 ml 1.5 M Tris HCl pH8.8 SDS 0.4%  
1.75 ml eau distillée  
5 µl APS 25%  
5 µl TEMED

#### *Gel de concentration*

0.668 ml acrylamide/Bis 29:1 30%  
1.3 ml 0.5 M Tris HCl pH6.8 SDS 0.4%  
3 ml eau distillée  
5 µl APS 25%  
5 µl TEMED

#### *Technique de moulage*

Le gel de migration est coulé dans un montage de 1 mm d'épaisseur jusqu'à une hauteur de 4 cm. Après la polymérisation, le gel de concentration est superposé et le peigne est inséré pour créer les puits.

### **Tampon de chargement (5X)**

314 mM Tris  
5% SDS  
50% glycérol  
5% β-ME  
74.6 µM bleu de bromophénol  
Ajusté à pH6.8 avec du HCl

### **Tampon de migration**

25 mM Tris  
192 mM glycine

0.1% SDS

### **Tampon de transfert**

192 mM glycine  
25 mM Tris

### **TBS**

153 mM Tris  
137 mM NaCl  
Ajusté à pH7.5 avec du HCl

### **TBST**

0.05% Tween 20 dans du TBS

### **TBST-BSA 1%**

1% BSA dans du TBST  
Filtrer à 0.22 µm

### **Électrochimiluminescence**

#### *Solution A*

25 mM Luminol  
400 µM acide p-coumarique  
0.1 M Tris HCl pH8.5

#### *Solution B*

0.02% peroxyde d'hydrogène  
0.1 M Tris HCl pH8.5

### **Solution de décapage**

25mM glycine  
1% SDS  
Ajusté à pH2.0 avec du HCl

## Annexe C Formulaire de consentement

### FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT

#### Donneurs

**Titre de l'étude :** Étude sur les propriétés immunomodulatrices des cellules stromales mésenchymateuses.

**Chercheurs responsables au CHU Sainte-Justine :**

Dr Elie Haddad, Dr Silvia Selleri

**Collaborateur :**

Dr Michel Duval

**Source de financement :** Fonds de recherche du Dr Haddad



**CHU Sainte-Justine**

Le centre hospitalier  
universitaire mère-enfant

Pour l'amour des enfants

Université  
de Montréal



#### Invitation à participer à un projet de recherche

Vous êtes en bonne santé et pour cette raison nous vous proposons de participer à ce projet de recherche. Nous avons besoin de prélèvements de sang d'individus sains, et ce, dans le but d'acquérir une meilleure compréhension du rôle des cellules souches de l'environnement de la moelle osseuse, appelées cellules stromales mésenchymateuses.

Nous vous invitons à lire ce formulaire d'information afin de décider si vous êtes intéressé à prendre part à ce projet de recherche. Il est important de bien comprendre ce formulaire. N'hésitez pas à poser des questions. Prenez le temps nécessaire pour prendre votre décision.

#### Nature de ce projet

Les cellules stromales mésenchymateuses sont isolées de la moelle osseuse et sont utilisables en clinique suite à une greffe de moelle osseuse ou de sang de cordon dans le but d'atténuer les complications possibles suite à la greffe. Elles ont également l'avantage d'être hautement tolérées par le receveur. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels ces cellules améliorent la prise de greffe permettrait d'augmenter les chances de guérison.

Les cellules stromales mésenchymateuses peuvent aussi être récoltées à partir de cellules humaines du sang provenant d'individus sains. Nous souhaitons donc étudier les propriétés particulières de ces cellules par l'utilisation de modèles en culture cellulaire et à l'aide d'animaux de laboratoire. Ce projet de recherche vise à mieux comprendre les mécanismes immunitaires des cellules stromales mésenchymateuses pour en optimiser l'utilisation en clinique, et de contribuer à la réduction des complications post-greffe.

#### Déroulement du projet

Votre participation implique une prise de sang de 10 ml, qui sera faite au CHU Ste-Justine.

Votre implication implique aussi que vous consentiez à ce que les échantillons de moelle non utilisés dans l'étude : " *Transplantation, immunologie et cryopréservation du sang de cordon. Reconstitution immunitaire après greffe de sang de cordon et de moelle dans un modèle de souris immunodéprimée.* ", soient utilisés dans la présente étude.



### **Avantages et bénéfices**

Vous ne retirerez aucun bénéfice direct en participant à cette étude.

### **Inconvénients et risques**

Les risques liés à cette étude sont donc les mêmes risques que toute autre prise de sang : douleur, ecchymose et infection au point de ponction.

### **Confidentialité**

Toutes les informations recueillies lors de la présente étude demeureront confidentielles et ne seront utilisées qu'à des fins de recherche à moins d'une autorisation de votre part ou d'une obligation de la loi. Pour ce faire, ces renseignements seront codés et mis sous clé.

Les échantillons biologiques seront conservés au laboratoire du Dr Élie Haddad pendant cinq ans après la fin de la recherche, sous la responsabilité du Dr Élie Haddad.

La confidentialité des échantillons sera assurée en leur assignant un code spécifique. Ce code permettra de vous lier à l'échantillon mais le décodage ne pourra se faire que par le chercheur principal ou par une personne déléguée par ce dernier. Votre échantillon ne portera pas de nom et ne permettra pas de vous identifier directement.

Afin de vérifier le bon déroulement de la recherche et d'assurer votre protection, il est possible qu'un délégué du comité d'éthique de la recherche du CHU Sainte-Justine, consulte les données de recherche. Cette personne est tenue de préserver la confidentialité des données.

Par ailleurs, les résultats de cette étude pourront être publiés ou communiqués dans un congrès scientifique, mais aucune information pouvant vous identifier ne sera alors dévoilée.

### **Commercialisation**

Votre participation pourrait contribuer à la création de produits commerciaux. Vous n'aurez cependant pas droit au partage d'éventuelles retombées économiques.

### **Compensation financière**

Aucune compensation n'est accordée pour votre participation à cette étude. Cette étude pourrait contribuer à la création de produits commerciaux, ou à la commercialisation plus large de produits existants, dont vous ne pourrez retirer aucun avantage financier.

### **Communication des résultats**

Nous ne vous communiquerons aucun résultat personnel. Cependant, vous pourrez communiquer avec l'équipe de recherche afin d'obtenir de l'information sur l'avancement des travaux ou les résultats généraux du projet de recherche. Par ailleurs, les résultats de cette étude pourront être publiés ou communiqués dans un congrès scientifique mais aucune information pouvant vous identifier ne sera dévoilée.

### **Personnes ressources**

Pour plus d'informations concernant cette recherche, contactez la coordonnatrice clinique du projet au CHU Sainte-Justine, Madame Renée Dicaire au (514)345-4931 poste 5074.  
Pour tout renseignement sur vos droits à titre de participant à ce projet de recherche, vous pouvez contacter le Commissaire local aux plaintes et à la qualité des services du CHU Sainte-Justine au (514) 345-4749.

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT**  
**Donneurs**



**Titre de l'étude :** Étude sur les propriétés immunomodulatrices des cellules stromales mésenchymateuses.

On m'a expliqué la nature et le déroulement du projet de recherche. J'ai pris connaissance du formulaire de consentement et un exemplaire m'a été remis. J'ai eu l'occasion de poser des questions auxquelles on a répondu à ma satisfaction. Après réflexion, j'accepte de participer à ce projet de recherche.

\_\_\_\_\_  
Participant (18 ans et plus)  
(Lettres moulées)

\_\_\_\_\_  
Signature

\_\_\_\_\_  
Date

J'ai expliqué au participant tous les aspects pertinents de la recherche et j'ai répondu aux questions posées. J'ai indiqué que la participation au projet de recherche est libre et volontaire et que la participation peut être cessée en tout temps.

\_\_\_\_\_  
Personne qui a obtenu le consentement  
(Lettres moulées)

\_\_\_\_\_  
Signature

\_\_\_\_\_  
Date