



Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :  
Étude des fonctions immunomodulatrices des lymphocytes T « Doubles-Négatifs »

par  
Sandra Boulos

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Microbiologie et Immunologie

Novembre, 2011

©, Sandra Boulos, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Étude des fonctions immunomodulatrices des lymphocytes T « Doubles-Négatifs »

Présenté par :  
Sandra Boulos

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dre Carolina Alfieri

Directeur de recherche : Dr Élie Haddad

Membre du jury : Dr Louis de Repentigny

## Résumé en français et mots clés

La réaction du greffon contre l'hôte (GvH) est responsable d'un grand taux de morbidité et de mortalité chez les patients recevant des greffes de cellules souches (GCSH) allogéniques. Dans ce contexte, les cellules T régulatrices sont largement étudiées et semblent avoir un grand potentiel d'utilisation dans le domaine de la thérapie cellulaire de la GvH. Parmi les populations cellulaires T régulatrices, les lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCRαβ<sup>+</sup> « Doubles-Négatifs » (DN), qui ne représentent que 1-3% des lymphocytes T, ont été décrits. Ces cellules ont des propriétés inhibitrices de la réponse immunitaire qui s'avèrent spécifiques aux antigènes auxquels elles ont préalablement été exposées. La répression de la réponse immunitaire par les cellules T DN régulatrices semble être un mécanisme important impliqué dans l'induction de la tolérance aux allo-antigènes. De plus, ces cellules confèrent une tolérance immunitaire dans des modèles de greffes allogéniques et xénogéniques. En effet, ces cellules ont la capacité d'inhiber la réaction contre un allo-antigène auquel elles ont été exposées, sans inhiber la réaction contre un allo-antigène inconnu. Les cellules T DN ont été isolées et caractérisées chez l'homme où elles ont la capacité d'interagir avec des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) par un contact cellulaire, comme chez la souris. Cependant, leur capacité immunomodulatrice reste inconnue chez l'humain. Notre objectif consistait donc principalement à étudier le rôle et le mécanisme d'action des cellules T DN régulatrices humaines *in vitro*, en étudiant leur capacité à inhiber une réaction lymphocytaire mixte (MLR).

Nous avons montré que les cellules T DN stimulées par un allo-antigène donné inhibent des cellules syngéniques effectrices dirigées contre ce même alloantigène mais n'inhibent pas des cellules syngéniques effectrices dirigées contre un autre alloantigène, démontrant ainsi la spécificité aux antigènes de ces cellules. De plus, les T DN non stimulées par un allo-antigène n'ont pas de rôle inhibiteur. Cependant, durant cette inhibition, nous n'observons pas de modulation de l'expression des marqueurs d'activation et d'induction de l'apoptose. Afin d'étudier le mécanisme d'action des cellules T DN, nous avons mesuré l'expression intracellulaire de la granzyme B. Les résultats démontrent que les cellules T DN stimulées expriment un niveau significativement plus élevé de granzyme B que les cellules T DN non-stimulées par l'allo-antigène. Ceci suggère que l'immunosuppression induite par les

cellules T DN stimulées pourrait passer par la voie granzyme B. Le mécanisme utilisé par ces cellules reste à être confirmé par nos futures expériences.

Mots Clés : GvH, Cellules T DN régulatrices, MLR, alloantigène, stimulation, tolérance, immunomodulation, granzyme B

**Abstract and key words**

Graft-versus-Host Disease (GvHD) is a major cause of morbidity and mortality in patients receiving an allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT). Many regulatory T cell populations have been studied and shown to have immunosuppressive properties in GvHD. Among these populations, Double Negative  $CD4^-CD8^-TCR\alpha\beta^+$  regulatory T cells (DN T) have been described. These cells represent 1-3% of all T cell lymphocytes and are known to have antigen-specific inhibitory functions of the immune response. The suppression of an immune response by DN T cells seems to be an important mechanism involved in the induction of tolerance to allo-antigens. Moreover, these cells also confer immune tolerance in models of allogeneic and xenogenic grafts. DN T cells have the ability to suppress syngeneic T  $CD4^+$  and T  $CD8^+$  cells in an antigen-specific manner. Therefore, these DN T cells can inhibit the reaction caused by syngeneic effector cells against a specific alloantigen to which they have been previously exposed. However, they cannot inhibit a reaction directed against an unknown alloantigen. Human DN T cells have been isolated and characterized as cells that have the capacity to interact with APCs by cell-to-cell contact, just like in mice. However, their immunomodulatory properties are still unknown in humans. The goal of our project was to study the role and immunomodulatory functions of human DN T cells in Mixed Lymphocyte Reactions (MLR).

The MLRs have allowed us to demonstrate that DN T cells, after having been stimulated by an allo-antigen, have an antigen-specific inhibitory function towards the syngeneic effector cells reacting against the same alloantigen that they have been exposed to. Interestingly, they do not inhibit the reaction of these effector cells against an unknown alloantigen. However, stimulated DN T cells did not modulate the expression of the activation markers expressed by the effector cells and did not give a death signal to these cells either. Moreover, we also wanted to study how DN T cells have an immunosuppressive activity. Therefore, we compared the expression of Granzyme B in stimulated versus non-stimulated cells. Our results suggest that DN T cells may use the Granzyme B pathway to immunosuppress the effector cells. In conclusion, our results demonstrate that DN T cells have an antigen-specific inhibitory function. The mechanism used by these DN T cells remains to be confirmed with our future experiments.

Keywords: GvHD, Regulatory DN T cells, MLR, allo-antigen, stimulation, tolerance, immunomodulation, Granzyme B

## Table des Matières

<b>Résumé en français et mots clés.....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract and Key Words.....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>ix</b>
<b>Chapitre 1: Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	1
1.1.1 Contexte.....	1
1.1.2 Source des cellules souches.....	1
1.1.3 Polymorphisme HLA.....	2
1.1.4 Réaction lymphocytaire mixte.....	3
1.2 Réaction du greffon contre l'hôte.....	3
1.2.1 Généralités.....	3
1.2.2 La GvH aiguë.....	4
1.2.3 Pathophysiologie de la GvH aiguë.....	4
1.2.4 Facteurs de risque de la GvH aiguë.....	5
1.2.5 La GvH chronique.....	7
1.3 Traitement de la GvH.....	7
1.3.1 Prophylaxie de la GvH.....	7
1.3.2 Thérapie conventionnelle de la GvH.....	8
1.3.3 Effet « Graft-versus-Tumor ».....	8
1.3.4 Thérapie cellulaire de la GvH.....	9
1.3.4.1 Les cellules « Natural Killer ».....	9
1.3.4.2 Les cellules souches mésenchymateuses.....	10
1.3.4.3 Les cellules T régulatrices.....	12
1.4 Les lymphocytes T doubles-négatifs.....	13
1.4.1 Notions de base.....	14
1.4.2 Phénotype.....	16
1.4.3 Profil d'expression des cytokines.....	16
1.4.4 Prolifération des T DN périphériques.....	17
1.4.5 Transfert du complexe peptide-CMH des APCs sur les T DN.....	17

1.4.6	Marqueurs d'activation.....	18
1.4.6.1	CD69.....	19
1.4.6.2	CD25.....	19
1.4.6.3	HLA-DR.....	19
1.4.7	Mécanismes d'apoptose.....	19
1.4.7.1	Introduction.....	19
1.4.7.2	Voies dépendantes des caspases.....	20
1.4.7.3	Voie extrinsèque.....	22
1.4.7.4	Fas-ligand Fas.....	22
1.4.7.5	TRAIL.....	23
1.4.7.6	Granzyme B et perforine.....	23
1.5	Hypothèse et objectifs de recherche.....	26
1.5.1	Hypothèse.....	26
1.5.2	Objectif principal.....	26
1.5.3	Objectifs spécifiques.....	26
<b>Chapitre 2</b>	<b>: Méthodologie.....</b>	<b>28</b>
2.1	Obtention des PBMCs humains provenant de donneurs sains.....	28
2.2	Purification des cellules T DN.....	28
2.3	Culture cellulaire.....	29
2.4	Réaction lymphocytaire mixte.....	29
2.5	Cytométrie en flux.....	32
2.6	Analyse statistique.....	33
<b>Chapitre 3</b>	<b>: Résultats.....</b>	<b>35</b>
<b>Chapitre 4</b>	<b>: Discussion.....</b>	<b>60</b>
<b>Chapitre 5</b>	<b>: Conclusion.....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 6</b>	<b>: Perspectives.....</b>	<b>74</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>.....</b>	<b>75</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1- Mécanisme de transfert du complexe CMH classe I-peptide et de suppression des cellules T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN murines.....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 2 - Schéma des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque.....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 3 - Voies de la mort cellulaire médiée par la GrzB.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 4 : Schéma temporel du déroulement de la réaction lymphocytaire mixte (MLR).....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 5 : Schéma des conditions effectuées durant la réaction lymphocytaire mixte (MLR).....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 6 - Isolation et amplification des cellules T doubles-négatives à partir de sang périphérique humain.....</b>	<b>37-38</b>
<b>Figure 7 - Phénotypage des cellules T doubles-négatives.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 8 - Prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> lors de la réaction lymphocytaire mixte (MLR) .....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 9 - Prolifération des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> lors de la réaction lymphocytaire mixte (MLR) .....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 10 - Expression du marqueur d'activation CD69 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 11- Expression du marqueur d'activation CD25 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 12 - Expression du marqueur d'activation HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 13 - Expression du marqueur d'activation CD69 au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 14- Expression du marqueur d'activation CD25 au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 15 - Expression du marqueur d'activation HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>52-53</b>
<b>Figure 16- Induction de l'apoptose précoce des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> .....</b>	<b>54-55</b>
<b>Figure 17 - Induction de l'apoptose précoce des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> .....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 18 - Expression de la protéine GrzB par les cellules T DN<sub>A</sub>.....</b>	<b>58</b>

**Figure 19 : Hypothèse du mécanisme de transfert du complexe CMH classe I-Peptide et de suppression des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> humaines.....71**

**Liste des abréviations :**

7AAD : 7-Amino-Actinomycin D  
APC : Antigen Presenting Cell  
APC : Allophycocyanin  
ALPS: Syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité  
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine  
CAD: Caspase-activated deoxyribonuclease  
CD3: Cluster of differentiation 3  
CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester  
cGvH : GvH chronique  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
DC: Dendritic Cell  
DD: Death Domain  
DN: Doubles-Négatives  
DISC: Death-inducing signaling complex  
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  
FADD : Fas-associated Death Domain  
FasL : Fas Ligand  
FITC: Fluorescein isothiocyanate  
FoxP3 : Forkhead box P3  
GCSH : Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques  
GrzB : Granzyme B  
GvH : Graft versus Host  
GvT : Graft versus Tumor  
HLA : Human Leucocyte Antigen  
IFN $\alpha$  : Interféron  $\alpha$   
IL-2 : Interleukin 2  
KIR : killer-cell-immunoglobulin-like receptor  
miH : Antigènes Mineurs d'Histocompatibilité  
MLR : Réaction Lymphocytaire Mixte  
MO : Moëlle Osseuse  
CSM : Cellule souche mésenchymateuse

MTOC : Microtubule Organizing Center  
NS: Natural Suppressor  
NK : Natural Killer Cell  
NKT: Natural Killer T Cell  
NOD: Non-obese Diabetic  
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells  
PBMC<sub>Airr</sub> : PBMC du donneur A irradiées  
PBSC : Peripheral Blood Stem Cells  
PE: Phycoerythrin  
PE-Cy7: Phycoerythrin-cyanine dye 7  
PS: Phosphatidylsérine  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
*scid*: Severe Combined Immunodeficiency  
TCR: T cell Receptor  
Th1: T helper Cell Subtype 1  
Th2: T helper Cell Subtype 2  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand  
TREC : Thymic Recent Emigrant Circle  
Treg: Regulatory T cell

## **Chapitre 1 : Introduction générale**

### **1.1 Greffe de cellules souches hématopoïétiques**

#### **1.1.1 Contexte**

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est au centre de trois domaines prometteurs de recherche clinique aujourd'hui, soit la thérapie par cellules souches, des techniques immuno-modulatrices et l'individualisation des thérapies oncologiques<sup>1,2</sup>. La première GCSH a été réalisée en 1957 et ses premiers succès ont été obtenus il y a environ 50 ans en 1959<sup>3</sup>. Dans un premier temps, la GCSH a permis le traitement des anémies héréditaires ainsi que des déficits immunitaires<sup>4,5</sup>. Ces derniers prédisposent les enfants à une multitude d'infections qui peuvent, dans certains cas, être fatales<sup>5</sup>. L'objectif est de remplacer le système hématopoïétique anormal par celui provenant d'un individu sain<sup>5</sup>. De plus, la GCSH permet aussi le traitement d'une variété de maladies hémato-oncologiques ayant un mauvais pronostic suite à une chimiothérapie conventionnelle et/ou une radiation myéloablatrice<sup>5</sup>. Bien que les GCSH allogéniques puissent causer la maladie du greffon contre l'hôte (GvH), elles sont aussi associées à une diminution des risques de rechutes malignes grâce à l'effet GvT « Graft-versus-Tumor »<sup>6</sup>.

#### **1.1.2 Source de cellules souches**

Les cellules souches hématopoïétiques utilisées pour la GCSH peuvent provenir de plusieurs sources. Les premières GCSH ont été effectuées à partir de Moëlle Osseuse (MO)<sup>7,8</sup>. Par la suite, des études comparant les cellules souches hématopoïétiques provenant du sang périphérique « peripheral-blood stem cells » (PBSCs) versus la MO, ont démontré que celles provenant du sang périphérique engendraient une sortie d'aplasie plus rapide, tout en augmentant les risques de GvH<sup>9,10,11</sup>. Cependant, les risques de rechute étaient diminués et le taux de survie était au total équivalent<sup>9-11</sup>. Aujourd'hui, en pédiatrie, la principale source de cellules souches reste toujours la MO<sup>12</sup>. Par ailleurs, les cellules souches du sang de cordon ombilical ont été identifiées en 1974<sup>13</sup> et utilisées pour la première fois pour réaliser une GCSH allogénique en 1988<sup>14</sup>. Ces cellules souches du sang de cordon possèdent plusieurs avantages<sup>5</sup>. Elles sont rapidement disponibles et le

développement d'une GvH est atténué. Donc, le pairage HLA est moins exigeant<sup>5</sup> en raison de l'imaturité relative des cellules T présentes dans le sang de cordon<sup>15</sup>.

### 1.1.3 Polymorphisme HLA

Le complexe majeur d'histocompatibilité est situé sur le chromosome 6 chez l'homme et s'étend sur environ 4 millions de paires de bases, contenant plus de 200 gènes<sup>16</sup>. Il existe trois gènes CMH classe I- $\alpha$  chez l'humain, nommés HLA-A, -B et -C<sup>17</sup>. Il existe aussi 3 paires de gènes CMH classe II  $\alpha$  et  $\beta$ , nommées HLA-DR, -DP et -DQ<sup>17</sup>.

Les antigènes HLA présentent des peptides provenant des pathogènes aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires<sup>18</sup>. Ceci permet la reconnaissance du soi et du non-soi<sup>18</sup>. Cependant, la crainte lors des transplantations est le phénomène de la reconnaissance des molécules HLA allogéniques du receveur par les lymphocytes T<sup>17</sup> du donneur, ce qui induit une GvH. La survie des greffes peut donc être mieux contrôlée suite à la réalisation des tests d'histocompatibilités HLA, entre les cellules du donneur et du receveur, et des critères de sélection du donneur<sup>17</sup>.

Le succès des GCSH peut donc être réduit par les complications post-greffe<sup>17</sup>. Les patients peuvent développer des infections opportunistes, ainsi que la GvH<sup>17</sup>. Donc, le risque de rejet ou de la non-prise de greffe ainsi que le risque de GvH s'élèvent d'autant plus que le degré de disparité HLA augmente<sup>19,20</sup>.

L'identification d'un donneur familial avec une compatibilité HLA est possible dans environ 20-30% des cas<sup>17</sup>. Sinon, un donneur non-apparenté compatible est recherché<sup>17</sup>. Il y avait initialement sélection des donneurs basée sur le typage sérologique HLA-A, -B et -DR<sup>17</sup>. Cependant, ce typage est difficile à cause de la diversité allélique qui ne peut être vérifiée par cette méthode<sup>17</sup>. En effet, les loci HLA peuvent être différents entre individus même s'ils sont HLA-A, -B et -DR identiques<sup>17</sup>. Des techniques moléculaires sont maintenant utilisées afin de vérifier la similitude des séquences alléliques HLA<sup>16,17</sup>. Le polymorphisme HLA est donc mieux identifié par ces techniques et permet un meilleur pairage entre donneur et receveur, induisant ainsi un meilleur taux de succès des GCSH provenant de la MO ou du sang périphérique<sup>17</sup>.

Par contre, ces techniques soulèvent le problème de la disponibilité des donneurs apparentés au niveau allélique<sup>17</sup>.

#### 1.1.4 Réaction lymphocytaire mixte

La réaction lymphocytaire mixte (MLR) allogénique a été décrite en 1964<sup>21-23</sup>. Cette technique permet l'étude des cellules ainsi que des molécules impliquées dans une réponse allogénique<sup>21,23</sup>. Elle a permis l'isolation et la caractérisation des molécules HLA-D, distincts des loci HLA-A, -B et -C<sup>24</sup>. De plus, elle a permis la génération *in vitro* des CTL CD8<sup>+</sup><sup>25</sup>. Ce qui caractérise la MLR est sa spontanéité *in vitro*, puisqu'il n'y a pas de pré-immunisation requise des cellules répondantes, contrairement à une réponse antigénique conventionnelle, qui ne peut être observée qu'*in vivo*<sup>25</sup>.

La MLR est une méthode couramment utilisée afin de vérifier l'histocompatibilité des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) entre un donneur potentiel et un receveur<sup>21,26</sup>. Les cellules sont mises en contact pendant quelques jours. Si le donneur et le receveur ne sont pas compatibles, il y aura stimulation des cellules entre elles et donc il y aura prolifération<sup>23</sup>. Si le donneur et le receveur sont compatibles, il n'y aura pas de prolifération<sup>23</sup>. La prolifération est mesurée à l'aide de Thymidine Tritiée [ $H^3$ ], de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ou de « Carboxyfluorescein succinimidyl ester » (CFSE)<sup>27-29</sup>. Lorsqu'on effectue une MLR unidirectionnelle, les PBMCs du receveur sont inactivées, soit par irradiation ou par mitomycine, pour qu'il y ait uniquement vérification de la prolifération du donneur<sup>22,23,26</sup>. Le contact des cellules provenant du donneur et du receveur peut donc engendrer l'activation, la prolifération et la mort de certaines cellules<sup>22,23</sup>.

### 1.2 Réaction du greffon contre l'hôte

#### 1.2.1 Généralités

La GvH est la complication principale suite à une GCSH allogénique<sup>30</sup>. Cette réaction est principalement médiée par les lymphocytes T<sup>31</sup>. Les lymphocytes T du donneur reconnaissent les cellules du receveur comme étrangères et il y a une attaque du receveur.

Les cellules « Natural Killer » (NKs) et les macrophages ont aussi un rôle dans le développement de la maladie (voir section 1.2.3.)<sup>32</sup>.

Il est à noter que certains types et sous-types cellulaires, comme certains lymphocytes T, les cellules NKs et les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) peuvent être utilisés dans la prévention ou le traitement de la GvH dans le cadre des thérapies cellulaires (voir section 1.3.4).

La physiopathologie de la GvH implique une cascade d'interaction du système humoral et cellulaire entre les cellules du donneur et du receveur<sup>33</sup>. Cliniquement, la GvH se développe sous deux formes, la GvH aiguë ou chronique.

### **1.2.2 La GvH aiguë**

La GvH aiguë se développe suite à la réaction des cellules du donneur contre les tissus de l'hôte<sup>30</sup>. Les trois tissus principaux affectés par la GvH aiguë sont la peau, le foie et le tractus gastro-intestinal<sup>30</sup>. Cliniquement, on suspecte une GvH aiguë lorsque le greffé développe les signes ou symptômes suivants : dermatite, phlyctène, éruption cutanée, des crampes douloureuses au niveau de l'abdomen avec ou sans diarrhée, une nausée et des vomissements persistants, une hépatite avec élévation de la bilirubine et/ou des enzymes hépatiques<sup>30</sup>. Classiquement, la GvH aiguë apparaît jusqu'à cent jours post-greffe, mais elle peut survenir plus tard<sup>30</sup>. Le diagnostic de la GvH aiguë repose sur des éléments cliniques. Cependant, puisque plusieurs de ces éléments sont non spécifiques à la GvH, une confirmation histologique peut être nécessaire, particulièrement si les signes et symptômes sont atypiques ou impliquent uniquement le foie ou l'intestin<sup>30</sup>.

### **1.2.3 Pathophysiologie de la GvH aiguë**

La pathophysiologie de la GvH aiguë est décrite en trois étapes.

La première implique le dommage tissulaire de l'hôte associé à une inflammation, causés par la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie<sup>5,30</sup>. En plus des dommages causés, une activation des cellules du receveur a lieu, spécialement au niveau intestinal<sup>5,30</sup>. La relâche

de produits microbiens par la flore intestinale et l'inflammation endommagent les tissus intestinaux<sup>5,30</sup>. Ceci mène à l'activation des cellules de l'immunité innée par les *pathogen recognition receptors* tels les *Toll-like-Receptors* et les *NOD-like receptors*<sup>5</sup>. Les cellules immunitaires activées vont ensuite sécréter des cytokines inflammatoires<sup>5,30</sup>.

Dans la seconde étape, les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) du receveur et du donneur ainsi que les cytokines inflammatoires déclenchent l'activation des cellules T du donneur, qui vont donc proliférer et se différencier en cellules effectrices<sup>5,34</sup>. Dans cette phase d'activation, les complexes mineurs d'histocompatibilité jouent un grand rôle, particulièrement lors d'une greffe d'un donneur apparenté HLA compatible<sup>5,30</sup>.

La voie d'activation des cellules T mène à la transcription des gènes de plusieurs cytokines, dont l'IL-2 et l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )<sup>30</sup>. Les cellules T produisant l'IL-2 et l'IFN $\gamma$  appartiennent au phénotype Th1, alors que les cellules produisant principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 sont du phénotype Th2<sup>35</sup>. Ces dernières modulent la GvH<sup>35</sup>.

Dans la troisième étape, définie comme la phase effectrice, les cellules T activées du donneur induisent une cytotoxicité contre les cellules cibles de l'hôte par l'entremise des interactions Fas-ligand Fas (FasL), Perforine-Granzyme B (GrzB) et la production de cytokines additionnelles, comme le TNF- $\alpha$  qui est produit principalement par les macrophages et les monocytes et ensuite par les lymphocytes T et les cellules Natural Killer (NKs)<sup>30</sup>. Le TNF- $\alpha$  est impliqué dans plusieurs étapes de la GvH, incluant l'induction de l'apoptose chez les cellules cibles par la voie du récepteur TNF- $\alpha$ , l'activation des macrophages, des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules B et T, la production stimulante de cytokines inflammatoires additionnelles (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 et du TNF- $\alpha$ ), l'augmentation de l'expression du HLA et la facilitation de la lyse des cellules T<sup>30,34,36,37-40</sup>.

#### **1.2.4 Facteurs de risque principaux de la GvH aiguë**

Les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) ou (Human Leucocyte Antigens-HLA) sont localisés sur le bras court du chromosome 6 à la position p21 chez l'humain<sup>41,42</sup>. Le CMH joue un rôle critique dans les réponses immunitaires humorales et cellulaires<sup>30</sup>. Les

antigènes du HLA classe I (HLA-A, -B, -C) ont une distribution très large et sont retrouvés au niveau de toutes les cellules nucléées<sup>30</sup>. Les antigènes HLA classe II (-DR, -DP et -DQ) sont généralement retrouvés au niveau des cellules impliquées dans la réponse immunitaire<sup>30</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> reconnaissent des antigènes étrangers au niveau du HLA classe II<sup>30</sup>. En parallèle, les produits HLA classe II sont particulièrement induits au niveau de la peau et du tractus gastro-intestinal, pouvant ainsi promouvoir un ciblage spécifique durant la GvH aiguë<sup>30</sup>. De plus, les cellules T CD8<sup>+</sup> jouent aussi un rôle dans le développement de la GvH, car elles reconnaissent les antigènes allogéniques présentés par les HLA classe I<sup>33</sup>.

Une greffe de MO provenant de donneurs apparentés partageant des antigènes HLA identiques a plus de chances de prise de la greffe et moins de risques de GvH qu'une greffe provenant d'un donneur apparenté ayant une incompatibilité HLA avec le receveur<sup>30</sup>. Cependant, une GvH aiguë est tout à fait possible lors de greffes identiques de donneurs apparentés, démontrant que d'autres facteurs contribuent à la réponse immunitaire<sup>30</sup>.

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (miH) sont des peptides dérivés de protéines intracellulaires présentés par les CMH aux cellules T du donneur<sup>4,30</sup>. L'alloréactivité dans le cas de donneurs apparentés avec HLA identiques, implique donc la reconnaissance, par les cellules T du donneur, de peptides du non-soi présentés à la surface des CMH des cellules du receveur<sup>30</sup>. Suite à la présentation des miH par les CMH aux cellules du greffon, par les T CD4<sup>+</sup> dans le contexte du CMH de classe II et par les T CD8<sup>+</sup> dans le contexte du CMH de classe I, la présence des peptides du non-soi à la surface des molécules du CMH active les cellules T et induit donc la GvH<sup>30</sup>.

Puisque nous disposons de la capacité de typer au niveau moléculaire la région HLA, il est évident que cette méthodologie devrait être considérée afin de sélectionner de façon optimale les donneurs compatibles non-apparentés<sup>30</sup>.

Ainsi, le facteur de risque le plus important de la GvH est la disparité HLA<sup>30</sup>. Toutefois, il existe également d'autres facteurs de risque. Lorsque le donneur et le receveur sont plus âgés, il y a un plus grand risque de développement de la GvH<sup>43</sup>. De plus, la différence de sexe a aussi un effet, particulièrement lorsque la femme est le donneur<sup>44</sup>. Par ailleurs,

l'intensité de la prophylaxie (voir section 1.3.1) altère le niveau de dommage tissulaire et donc prédispose à une plus grande inflammation causée par les cellules alloréactives<sup>30</sup>. De plus hautes doses de radiation accroissent les risques d'une GvH et l'utilisation récente des régimes préparatifs non-myéloablatifs a mené à une diminution de l'incidence de la GvH aiguë<sup>45,46</sup>.

### **1.2.5 La GvH chronique**

La réaction du greffon contre l'hôte chronique (cGvH) est la principale cause de morbidité et de mortalité suite aux GCSH réalisés chez les patients cancéreux<sup>47-51</sup>. Malgré le fait que l'incidence des cGvH pédiatriques est plus faible par rapport aux adultes<sup>52-55</sup>, celle-ci a récemment augmenté à la suite de l'utilisation plus fréquente de cellules souches périphériques ainsi que de donneurs non-apparentés<sup>12,56-58</sup>.

Dans le passé, la cGvH était caractérisée par des manifestations de dérégulation auto-immunes et allo-immunes se produisant jusqu'à cent jours post-GCSH allogénique<sup>54,59,60</sup>. Présentement, les critères diagnostiques sont élargis pour inclure une dysfonction immunitaire pouvant se dérouler au cours des 100 premiers jours et jusqu'à 3 ans post-greffe<sup>60,61</sup>. Tous les organes du corps peuvent être atteints de la cGvH, contrairement à la GvH aiguë, qui atteint la peau, l'intestin et le foie<sup>60</sup>.

## **1.3 Traitement de la GvH**

### **1.3.1 Prophylaxie de la GvH**

La prophylaxie classique consiste en une combinaison d'immunosuppresseurs comprenant un inhibiteur de la calcineurine, comme la cyclosporine ou le tacrolimus, afin d'inhiber la fonction des cellules T, associé à du méthotrexate pour une courte durée<sup>62,63</sup>. Malgré l'utilisation d'autres types de prophylaxie, il a été démontré que celle-ci permet un équilibre entre la GvH et l'effet GvT lors d'une greffe entre donneurs apparentés identiques, suite à une chimiothérapie ablative<sup>62,63</sup>.

Pour les greffes de plus haut risque, soit non-apparentées, avec des patients âgés ou des patients ayant reçu un conditionnement pré-greffe agressif, la meilleure prophylaxie n'est pas bien déterminée<sup>64</sup>. Chez les patients recevant des greffes non-apparentés, une immunosuppression plus intense est nécessaire<sup>30</sup>. Des méthodes de déplétion des cellules T *ex-vivo*<sup>65</sup> et de déplétion pharmacologique de cellules T *in vivo* (antithymocyte globulin ATG<sup>66</sup>, alemtuzumab<sup>67</sup>) sont utilisées afin de réduire l'incidence d'une GvH aiguë<sup>30</sup>.

En général, ces traitements réduisent le développement de la GvH aiguë mais augmentent les infections, dû au délai de la reconstitution immunitaire, et les rechutes à cause de la diminution de l'effet GvT<sup>30</sup>. De plus, l'administration d'immunosuppresseurs diminue la chance de réussite de la GCSH, en particulier lorsque les CMH sont non-apparentées<sup>4</sup>.

### 1.3.2 Thérapie conventionnelle de la GvH

Les GvH de grades II à IV sont traitées en ajoutant de la méthylprednisone à l'immunosuppression prophylactique<sup>30</sup>. Les patients ne répondant pas aux corticostéroïdes ont un mauvais pronostic et il n'y a pas d'approche standardisée pour les traiter<sup>30</sup>. Plusieurs traitements sont étudiés, soit la photochimiothérapie extracorporelle<sup>68</sup>, la Pentostatine<sup>69,70</sup>, le Sirolimus<sup>71</sup>, l'Infliximab<sup>72</sup>, l'ATG et l'Alemtuzumab<sup>73</sup>. En général, certains de ces agents produisent des réponses, mais la mortalité due aux infections demeure élevée<sup>30</sup>.

### 1.3.3 Effet « Graft versus Tumor »

Bien que les cellules de la MO et les PBSCs mobilisées au G-CSF soient enrichies en progéniteurs hématopoïétiques, ils contiennent des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> αβ<sup>+</sup><sup>4</sup>. Ces dernières permettent la prise de greffe hématopoïétique, l'immunité reconstituée des cellules T ainsi que la médiation d'un effet antitumoral, aussi connu sous le nom de « Graft versus Tumor » (GvT)<sup>74</sup>. Des cellules matures T αβ<sup>+</sup> contenues dans les allogreffes reconstituent le système immunitaire et peuvent donc éradiquer les cellules malignes chez le receveur<sup>74</sup>.

Plusieurs études cliniques décrivent l'effet GvT<sup>6,75</sup>. D'abord, il y a une corrélation entre les patients développant une GvH et la réduction de la rechute leucémique<sup>6,75</sup>. Ensuite, les

patients recevant des greffes déplétées en cellules T ont deux fois plus de chances de développer une rechute<sup>6,75</sup>. Finalement, une infusion post-greffe de lymphocytes du donneur permet une rémission complète des patients ayant rechutés de leur pathologie hématologique suite à une GCSH allogénique<sup>6,75</sup>.

Le mécanisme GvT est décrit comme la reconnaissance des antigènes d'histocompatibilité majeurs et mineurs spécifiques du receveur par les cellules T du donneur, bien que les NKs semblent aussi avoir un effet<sup>32,76-79</sup>. L'importance de l'effet GvT dépend de l'immunogénicité des tumeurs ainsi que de la prolifération respective des cellules tumorales du receveur et des cellules immunitaires du donneur<sup>80</sup>.

Étant donné que les mêmes cellules (lymphocytes T du greffon) sont responsables de l'effet bénéfique GvL et de l'effet délétère GvH, il serait par conséquent intéressant de développer des thérapies cellulaires permettant de maximiser le premier sans induire le second. Jusqu'à présent, la prophylaxie de la GvH se fait par l'administration de médicaments (cyclosporine et méthotrexate).

### **1.3.4 Thérapie cellulaire de la GvH**

De nouvelles approches pour promouvoir les effets positifs des cellules T du donneur sans induire une GvH sont nécessaires afin que le potentiel thérapeutique des GCSH allogéniques soit maximisé<sup>5</sup>. Plusieurs types cellulaires sont étudiés afin de développer une thérapie prometteuse contre la GvH<sup>5</sup>.

#### **1.3.4.1 Les cellules « Natural Killer »**

Certaines études montrent que les cellules NKs permettent la diminution de la GvH tout en augmentant l'effet de la GvT<sup>81</sup>. Les populations cellulaires NKs présentent une hétérogénéité fonctionnelle du fait qu'elles expriment une panoplie étendue de récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface<sup>82</sup>. En particulier, les cellules NKs humaines expriment une variété de récepteurs inhibiteurs spécifiques au HLA-classe I, qui incluent les « killer-cell-immunoglobulin-like receptors » (KIRs) et les hétérodimères CD94/NKG2A<sup>82</sup>. Des données récentes ont démontré que non seulement les récepteurs

KIRs inhibiteurs mais aussi les activateurs ont un rôle critique dans la reconnaissance et l'attaque des blastes leucémiques et de la GvL<sup>83</sup>.

Plusieurs études ont démontré que les NKs pouvaient supprimer le développement de la GvH et maximiser la réponse anti-tumorale chez la souris<sup>81</sup>. La fonction effectrice principale des cellules NKs est d'éliminer les cellules cibles potentielles et d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale par une lyse cellulaire directe et par la production de cytokines<sup>84</sup>. Des études ont démontré que la lyse effectuée par les NKs envers les APCs de l'hôte pouvaient supprimer le développement de la GvH, car ces APCs sont essentielles à l'activation des cellules T provenant du donneur et impliquées dans le développement de la GvH<sup>85</sup>. Des expériences *in vitro* ont démontré que les cellules NKs lysent les cellules T autologues activées, et ce, autant dans un contexte murin qu'humain<sup>86,87</sup>. Lorsque les cellules T activées se mettent à exprimer les ligands du NKG2D, elles sont alors susceptibles d'être lysées par les cellules NKs<sup>81</sup>. Les récepteurs activateurs NKG2D, exprimés au niveau de la majorité des cellules NKs<sup>88</sup>, se lient aux ligands typiquement exprimés sur les cellules stressées, transformées ou tumorales<sup>88-91</sup>. Dans le cadre d'une greffe allogénique, les cellules NKs régulent aussi les cellules T syngéniques du donneur aux stades critiques de l'activation et de la prolifération des cellules T, ce qui permet la réduction de la sévérité et le délai de la progression de la GvH<sup>81</sup>. Il a été également démontré *in vivo* que les cellules NKs activées autologues du donneur lysent directement les cellules T activées alloréactives induisant la GvH<sup>81</sup>.

L'alloréactivité des NKs provenant du donneur réduit le risque d'une rechute leucémique, ne cause pas de GvH et améliore la survie d'une série de patients ayant reçu une greffe haploidentique<sup>32</sup>.

#### **1.3.4.2. Les cellules souches mésenchymateuses**

Les CSMs constituent une population cellulaire connue pour ses propriétés immunomodulatrices, démontrées *in vitro* et *in vivo*. Des études cliniques explorant l'effet de ces CSMs sur la GvH aiguë ont donc été menées<sup>92,93</sup>. Les CSMs ont la capacité d'immunosupprimer la prolifération lymphocytaire induite par des mitogènes ou dans le cadre de cultures lymphocytaires mixtes<sup>94-96</sup>. Elles peuvent aussi inhiber la prolifération des

cellules T cytotoxiques<sup>97</sup> et échapper à la reconnaissance des cellules T alloréactives<sup>95,96,98</sup>. Plusieurs études ont démontré que les CSMs ont aussi un rôle immunosuppresseur puissant *in vivo*<sup>99</sup>. Par exemple, il a été démontré que les CSMs retardent le rejet d'une greffe de peau histocompatible dans des modèles simiesque<sup>100</sup> et murin<sup>101,102</sup>. Cependant, le lien entre ces modèles précliniques et une étude clinique visant à améliorer la GvH aiguë chez l'humain demeurait risqué<sup>99</sup>. Par la suite, l'équipe de Tisato *V et al.* a généré un modèle murin humanisé de la GvH aiguë chez la « nonobese-diabetic/severe combined immunodeficient mouse » (souris NOD/SCID) ayant reçu une greffe de cellules humaines mononuclées issues de sang périphérique<sup>103</sup>. Après un traitement hebdomadaire de CSMs provenant du sang de cordon, il y avait une diminution significative des cellules T humaines dans le sang de la souris<sup>103</sup>. Une diminution du dommage tissulaire et une augmentation de la survie des souris ont également été observées<sup>103</sup>. Cependant, l'effet thérapeutique n'était effectif que lorsque les CSMs étaient administrées plusieurs fois au cours du suivi de la GvH (de manière hebdomadaire), et non dans le cas d'une injection unique<sup>103</sup>.

Dans un autre modèle murin, l'administration des CSMs a retardé le développement de la GvH et amélioré la survie<sup>104</sup>. On a aussi remarqué que l'injection des CSMs augmente le nombre de lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires<sup>104</sup>. En présence des CSMs, les lymphocytes T acquièrent un profil immunophénotypique distinct (CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) alors que les cellules dendritiques diminuent l'expression du CCR7<sup>104</sup>. Ces résultats suggèrent que les CSMs inhibent la GvH en diminuant l'activation des cellules T et en promouvant leur migration aux organes lymphoïdes secondaires, où se produirait une régulation de ces lymphocytes allogéniques<sup>104</sup>.

Il est à noter que les résultats des études portant sur les CSMs ne concordent pas toujours<sup>99</sup>. Par exemple, plusieurs modèles murins de la GvH impliquant des donneurs-receveurs CMH non-apparentés ne démontraient pas d'effet thérapeutique des CSMs<sup>105-107</sup>. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à ces différences, soient la source des CSMs (MO, sang de cordon, tissu adipeux), leur méthode d'isolation<sup>108</sup>, le processus d'immunodéplétion des précurseurs myéloïdes<sup>109</sup> ou la dose et la fréquence de l'administration des CSMs<sup>99</sup>. Il se pourrait aussi que les cellules soient rejetées<sup>99</sup>. Ceci expliquerait pourquoi les effets anti-GvH des CSMs ne sont pas observés dans certaines études précliniques<sup>99</sup>.

### 1.3.4.3 Les cellules T régulatrices

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) jouent un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance du soi. Il a été démontré que ces populations cellulaires sont impliquées dans la régulation négative des réponses immunitaires dans les maladies auto-immunes, dans le rejet des transplantations, dans l'atténuation de la GvH ainsi que dans la modulation de la réponse immunitaire contre les tumeurs<sup>110-112</sup>. Ils sont aussi requis pour contrôler la réponse immunitaire aux pathogènes chroniques et aux bactéries commensales de l'intestin<sup>113</sup>. Il existe une variété de sous-populations qui possèdent des propriétés immunorégulatrices<sup>110</sup>. Les cellules Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Forkhead box P3<sup>+</sup> (FoxP3) T représentent la sous-population de Tregs la plus étudiée, chez une panoplie de modèles animaux ainsi que chez les humains<sup>110,111</sup>. Il existe plusieurs types de Tregs<sup>113</sup>. Elles sont classées selon leur niveau d'expression du Foxp3 et selon leurs lieux d'activation<sup>113</sup>. Les Tregs naturels sont différenciés dans le thymus, les Tregs inductibles le sont dans le sang périphérique<sup>113</sup>. Les Tregs de type 1 (cellules Tr1) n'expriment pas le Foxp3 mais sécrètent l'IL-10 en présence d'un antigène<sup>113</sup>. Il existe également des Tregs dites « doubles-négatives » (T DN) qui feront l'objet de la prochaine section (voir section 1.4).

L'administration de chacun de ces types cellulaires permet une prévention efficace du rejet de greffe et de la GvH dans les modèles murins<sup>113,114</sup>. Plusieurs études cliniques de phase I ont été effectuées et plusieurs autres sont en cours afin d'étudier les effets de ces cellules lorsqu'administrées suite à une GCSH et pour le diabète de type I<sup>113,114</sup>.

Les cellules Tregs naturelles ont donné des résultats prometteurs pour la prévention de la GvH dans un modèle murin<sup>113,114</sup>. Les cellules peuvent être purifiées et amplifiées à partir du sang périphérique et du sang de cordon en présence de la rapamycine, des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ainsi que de l'IL-2<sup>115,116</sup>. Ces cellules ont des propriétés immunosuppressives à la fois *in vitro* ainsi que dans un modèle xénogénique de la GvH<sup>117</sup>. Un essai clinique a été lancé afin d'étudier leurs capacités immunosuppressives au niveau de la GvH chez l'humain suivant une GCSH d'un donneur syngénique HLA compatible<sup>113</sup>.

Les Tregs inductibles sont requises non seulement pour la tolérance périphérique mais aussi pour la prévention de certaines maladies, comme la maladie lymphoproliférative généralisée en réponse à certaines infections chroniques ou le diabète de type I, à l'instar des Tregs naturelles<sup>118</sup>. Certaines études contredisent cependant ces observations<sup>119-121</sup>. Les cellules Tregs murines peuvent aussi être induites et amplifiées *in vitro* lorsque les cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sont stimulées par le TGFβ<sup>122,123</sup>. La stimulation par le TGFβ et la rapamycine induit l'expression du Foxp3 chez les cellules T naïves humaines<sup>124</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) et elles acquièrent une fonction suppressive stable<sup>114,125</sup>. Finalement, ces cellules inhibent la GvH dans un modèle murin xénogénique<sup>117</sup>. Cette démonstration suggère qu'elles serviront dans les thérapies cellulaires pour les maladies humaines<sup>113</sup>. Une souris transgénique pour le gène Foxp3 a été créée. Une étude est en cours dans ce modèle, cherchant à supprimer la GvH de façon spécifique à l'antigène<sup>113</sup>.

Finalement, les cellules Tr1 sont caractérisées par le phénotype suivant : CD25<sup>-</sup>, Foxp3<sup>-</sup>, IL-10<sup>+</sup>, IL-4<sup>-126</sup>. Ces cellules spécifiques aux alloantigènes peuvent être induites *in vitro* à partir de cellules T naïves en les mettant en présence continue de l'alloantigène et de l'IL-10<sup>113</sup>. Il n'existe malheureusement aucun mécanisme pour isoler les Tr1 spécifiques des autres cellules T<sup>127</sup>. Cela dit, ces dernières sont anergiques et leur co-injection ne créera pas d'effet GvH, ni n'altérera l'effet anti-GvH des Tr1<sup>127</sup>. Les cellules de type Tr1 ont un avantage pour la thérapie cellulaire que les autres cellules n'ont pas : elles ont besoin de rencontrer l'antigène pour sécréter de l'IL-10 et il y a donc moins de chances qu'il y ait une immunosuppression systémique<sup>113</sup>. Il y a un essai clinique en cours pour étudier la capacité des cellules Tr1 à prévenir la GvH<sup>113</sup>.

#### 1.4 Les cellules T doubles-négatives

Les cellules T double-négatives (DN) sont des cellules T TCRαβ<sup>+</sup> qui sont CD4<sup>-</sup> et CD8<sup>-</sup>. Leur rôle est globalement inconnu mais certaines données expérimentales suggèrent que ces cellules sont des T régulatrices générées dans le sang périphérique<sup>112</sup>. Ces cellules T DN démontrent la capacité d'inhiber ou de moduler des réponses immunitaires<sup>112</sup>. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux cellules DN humaines. Chez la souris et chez l'humain, environ 1-3% des cellules T périphériques sont des cellules DN<sup>110,128-130</sup>. Les

cellules T DN diffèrent des autres cellules T régulatrices par leurs marqueurs de surface et leur profil d'expression de cytokines<sup>112</sup>.

#### 1.4.1 Notions de base

Avant que les cellules T « doubles-négatives » (DN) soient reconnues comme des lymphocytes T, elles étaient classées parmi les cellules « natural suppressor » (NS)<sup>131-133</sup>. Ces cellules étaient retrouvées dans la rate et la MO des souris quelques semaines après leur naissance<sup>131,134,135</sup>. Celles-ci avaient des propriétés immunosuppressives *in vitro* et *in vivo*, sans avoir des fonctions « natural killer »<sup>132,133</sup>. Elles conféraient une suppression de fonctions immunitaires, soit la prolifération aux mitogènes, la stimulation cellulaire allogénique *in vitro*, la génération de cellules T cytolytiques *in vitro* et finalement la GvH *in vivo*<sup>136</sup>.

L'activité suppressive naturelle des cellules NS en tant que lymphocytes T a été décrite en 1987<sup>137</sup>. Certaines études avaient démontré que ces cellules NS appartenaient aux lymphocytes T à cause du réarrangement génique de la chaîne  $\beta$  du TCR<sup>138</sup>. De plus, ces cellules exprimaient les transcrits d'ARNm entiers des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>138</sup>.

L'équipe de Strober S. *et al.* a démontré pour la première fois que les lymphocytes T, ayant des propriétés immunosuppressives, exprimaient le TCR $\alpha\beta$  et qu'elles étaient CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-139</sup>. Il s'agissait donc des lymphocytes T doubles-négatives (T DN) murines<sup>139</sup>. Ensuite, il a été démontré que l'activité immunosuppressive des T DN était non restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité<sup>111,139</sup>. Cependant, le rôle du complexe TCR demeurait à être élucidé dans le cadre de leurs fonctions immunosuppressives<sup>139</sup>.

Par la suite, chez la souris, les cellules T DN régulatrices ont été identifiées et caractérisées comme étant spécifiques aux antigènes<sup>112</sup>. De plus, dans un modèle murin, elles ont la capacité d'atténuer spécifiquement les réponses immunitaires dirigées contre les allo-antigènes *in vitro* et *in vivo*<sup>112</sup>. Les clones des cellules T DN ainsi que les cellules primaires peuvent spécifiquement tuer les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> activées avec la même spécificité du TCR<sup>112,130,140</sup>. Une infusion pré-greffe de cellules T DN préalablement

activées *in vitro* mène à une prolongation de greffe cutanée spécifique au donneur<sup>112</sup> et de cœur chez la souris<sup>141</sup>. Les cellules T DN jouent également un rôle régulateur dans les maladies auto-immunes et infectieuses<sup>142</sup>.

Afin d'expliquer leur mécanisme d'action, il a été suggéré, chez la souris, que les cellules T DN induisent une suppression, spécifique aux antigènes, des cellules syngéniques effectrices par l'entremise d'un mécanisme unique. Les cellules T DN pourraient utiliser leur TCR afin d'acquérir les complexes CMH-peptide allogéniques des APCs<sup>142</sup>. Les cellules T DN utiliseraient leurs nouveaux complexes CMH-peptide pour piéger les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ces dernières reconnaîtraient ce même complexe allogénique sur les T DN par des mécanismes de contact cellulaire et par interaction Fas-FasL<sup>112</sup>.

Chez l'humain, comme chez la souris, les lymphocytes T DN sont retrouvées au niveau des tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes<sup>143</sup>. Elles sont retrouvées chez les individus sains mais leur expansion clonale ou oligoclonale a été décrite chez des patients avec maladies auto-immunes (ALPS)<sup>144</sup> ou des immunodéficiences combinées avec des signes de GvH autologue<sup>145</sup>.

Chez l'humain, les cellules T DN auraient des propriétés similaires que chez la souris et pourraient aussi acquérir le complexe HLA-A2-peptide des cellules dendritiques (DCs) allogéniques<sup>111</sup>. Cependant, leurs rôles demeurent nébuleux et peu d'études au sujet de cette population cellulaire ont été effectuées. Les cellules T DN humaines exprimant le TCR $\alpha\beta$  mais non le CD4 et le CD8 sont retrouvées dans la périphérie et les ganglions lymphatiques d'individus sains<sup>111</sup>. De plus, elles sont augmentées chez des patients avec des maladies auto-immunes comme le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS), car elles ont des défauts d'apoptose<sup>146</sup>.

Jusqu'à présent, la fonction et l'ontogénie des cellules T DN demeurent nébuleuses. Il a été montré qu'il existait une corrélation entre la diminution de l'effet GvH et l'augmentation du nombre de cellules T DN chez les patients ayant reçu une GCSH<sup>147</sup>. Cependant, l'effet des cellules T DN sur les T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au repos ainsi que leur potentiel immunorégulateur et leur mécanisme de suppression chez l'humain restent à déterminer.

### 1.4.2 Phénotype

Afin d'étudier le phénotype des cellules T DN murines, des modèles de souris transgéniques ont été créés<sup>148</sup>. Les études ont démontré que les clones des cellules T DN étaient  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ ,  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD25}^+\text{CD28}^-\text{CD44}^-\text{CD30}^{+112}$ . En utilisant des modèles transgéniques différents, les auteurs ont pu démontrer qu'elles étaient aussi  $\text{CD44}^{\text{low}}\text{CD25}^-\text{CD69}^-\text{CD122}^-\text{FoxP3}^-\text{Ly6A}^{\text{high}149}$ . De plus, elles expriment plusieurs marqueurs démontrant qu'elles sont naïves, soit le CD3, le CD62L, le CD45RB et un niveau faible de CD5<sup>149</sup>. Ceci explique donc que les cellules T DN représentent une population de cellules T régulatrices distincte<sup>112</sup>.

Chez l'humain, le phénotype des DN a été étudié de façon extensive par Fischer K. *et al*<sup>111</sup>. Dans cette étude, il a été montré qu'il existe deux populations de cellules T DN dans le sang, soit les cellules DN naïves  $\text{CD45RA}^{\text{bright}}\text{CCR7}^+$  et les DN matures  $\text{CD45RA}^{\text{low}}\text{CCR7}^{-111}$ . La majorité des cellules T DN seraient, selon cette étude, en phase de maturation avec un phénotype  $\text{CD27}^+\text{CD28}^-$  et exprimeraient fortement le CD95, mais seraient négatives pour les marqueurs d'activation CD25 et CD69<sup>111</sup>. De plus, les cellules T DN humaines exprimeraient la perforine mais non la GrzB<sup>111</sup>. Aussi, les cellules T DN n'exprimeraient pas les marqueurs de surface des « Natural Killer cells » (NK), soit le CD16 et le CD56<sup>111</sup>.

### 1.4.3 Profil d'expression des cytokines

Les T DN murines sécrètent des cytokines avec un profil similaire aux cellules T CD8<sup>+</sup>, soit des niveaux équivalents de transcrits d'IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et il n'y a aucune expression d'ARNm correspondant à l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-13. De plus, chez la souris, l'ARNm de l'IL-10 était exprimé chez les cellules T CD8<sup>+</sup> mais non chez les T DN<sup>112</sup>.

Les cellules T DN transgéniques murines stimulées par activation antigénique et en présence de cytokines produisent un niveau élevé d'IFN- $\gamma$ . De plus, elles produisent aussi une quantité élevée d'IL-10<sup>110</sup>.

Les cellules T DN et T CD4<sup>+</sup> humaines activées soit par des cellules dendritiques (DCs) allogéniques ou par des billes anti-CD3<sup>+</sup> et anti-CD28<sup>+</sup> ont été comparées au niveau de leur profil d'expression de cytokines<sup>111</sup>. Les cellules T DN activées sécrètent 3 à 4 fois plus d'IFN- $\gamma$  que les cellules T CD4<sup>+</sup><sup>111</sup>. Contrairement aux cellules T CD4<sup>+</sup>, elles ne produisent ni IL-2, ni IL-5 et un niveau très faible d'IL-4 et d'IL-10<sup>111</sup>. Il est à noter que ces résultats contredisent le profil d'expression de cytokines des T DN transgéniques mentionnées ci-dessus, concernant la sécrétion de l'IL-10<sup>110,111</sup>.

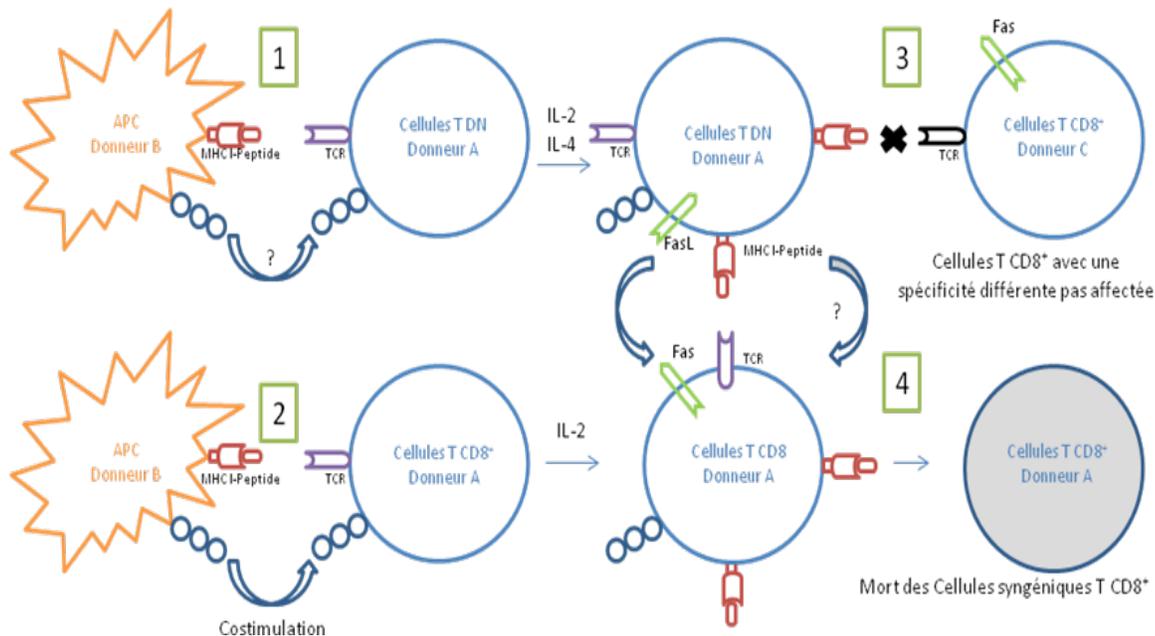
#### **1.4.4 Prolifération des T DN périphériques**

L'analyse des TRECs, un marqueur d'émigration thymique récente, comparant les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> aux T DN, démontre que le nombre de TRECs présents chez ces dernières est 2 à 6 fois plus faible que ceux des CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>111</sup>, ce qui suggère que les DN ont proliféré davantage comparativement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>.

#### **1.4.5 Transfert du complexe peptide-CMH des APCs sur les cellules T DN**

L'équipe de Li Zhang a démontré, chez la souris, que les cellules T DN ont la capacité, par l'entremise de leur TCR, d'enlever le complexe CMH-peptide des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) allogéniques pour ensuite les présenter à leur surface (figure 1)<sup>112</sup>.

L'équipe de Fischer K. *et al.* aurait aussi observé ce phénomène *in vitro* sur des cellules humaines. Il requiert un contact cellulaire. Dans ce modèle, les cellules T DN HLA-A2<sup>-</sup> enlèvent le complexe CMH-peptide d'APCs HLA-A2<sup>+</sup> et deviennent donc HLA-A2<sup>+</sup> aussi tôt que deux heures après la co-incubation de ces cellules<sup>111</sup>. Le transfert se fait de manière croissante et accumulative de 24 heures à 48 heures après le début de l'incubation des cellules T DN avec les DCs<sup>111</sup>.



**Figure 1 : Mécanisme de transfert du complexe CMH classe I-peptide et de suppression des cellules T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN murines.** Représentation schématique du transfert du CMH classe I-peptide de la surface des APCs du donneur B par les cellules T DN pour les présenter à leur surface (1). Lorsque les cellules T CD8<sup>+</sup> acquièrent une spécificité pour le même complexe CMH de classe I-peptide des APCs du donneur B (2), les cellules T DN leur envoient un signal de mort (4). Cependant, les cellules T CD8<sup>+</sup> avec une spécificité du TCR différente ne reçoivent pas de signal de mort par les cellules T DN (3). Adapté de Zhang Z-X. *et al.* Nature Medicine (2000)<sup>112</sup>

#### 1.4.6 Marqueurs d'activation

Les marqueurs d'activation sont des marqueurs dont l'expression peut être induite au niveau des cellules T, des cellules B ainsi que des cellules NKs par stimulation lors d'une inflammation ou par des mitogènes<sup>150</sup>. Les marqueurs d'activation généralement mesurés sur les lymphocytes T sont les suivants : CD69, IL-2R (CD25) et HLA-DR<sup>151-153</sup>. Ces molécules sont exprimées de façon négligeable ou pas du tout sur des cellules naïves et à l'état de repos<sup>154</sup>. L'expression de ces derniers augmente lorsque les cellules sont activées<sup>151,155</sup>.

### 1.4.6.1 CD69

Le CD69 est reconnu comme étant un « early activation antigen »<sup>150</sup>. Il est exprimé uniquement lorsque les cellules T sont effectrices et non lorsqu'elles sont naïves ou mémoires<sup>154</sup>. L'expression du CD69 est augmentée 4 heures après l'activation des lymphocytes T et déclenche l'activité des protéines tyrosines kinases, du flux calcique ainsi que de la transcription de l'IL-2 et du *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ )<sup>150,151,153,156</sup>.

### 1.4.6.2 CD25

Entre 12 et 24 heures après le contact des lymphocytes T avec l'antigène, l'expression de l'IL-2R (CD25) augmente au niveau de leur membrane cellulaire, ce qui facilite la production d'un récepteur d'IL-2 à haute-affinité qui initie la prolifération et la différenciation<sup>150,152,157</sup>.

### 1.4.6.3 HLA-DR

Finalement, l'expression du HLA-DR augmente entre 48 et 60 heures au niveau des cellules T, concordant avec la présentation d'antigènes et la transition vers la réponse immunitaire adaptative<sup>150,152</sup>.

## 1.4.7 Mécanismes d'apoptose

### 1.4.7.1 Introduction

Étant donné que les cellules T DN pourraient induire une apoptose des cellules qu'elles inhibent, il est important de décrire les différents mécanismes d'apoptose. L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus ordonné qui permet le déclenchement de la mort des cellules lorsqu'elles reçoivent un signal spécifique<sup>158</sup>. À priori, ceci permet une homéostasie hématopoïétique<sup>158</sup>. Les cellules apoptotiques subissent une réduction de taille, une modification du cytosquelette, une condensation de la chromatine et finalement, la dégradation de l'ADN<sup>159,160</sup>. De plus, il y a aussi reversement des lipides de la membrane plasmique et donc la phosphatidylserine, habituellement retrouvée dans le feuillet interne

de la membrane, se retrouve sur le feuillet externe pour ainsi remplacer la phosphatidylcholine durant l'apoptose<sup>159</sup>. Ainsi, la phosphatidylserine est utilisée afin de mesurer l'entrée en apoptose des cellules.

L'apoptose n'induit pas une inflammation, car les cellules changent de morphologie et seront rapidement phagocytées principalement par les macrophages<sup>160</sup>. L'apoptose passe par des voies dépendantes ou indépendantes des caspases<sup>160</sup>.

#### **1.4.7.2 Voies dépendantes des caspases**

Trois voies principales dépendantes des caspases ont été identifiées, soit la voie extrinsèque, la voie intrinsèque (figure 2) et la voie cytotoxique perforine/GrzB (figure 3)<sup>158</sup>. La voie extrinsèque est médiée par l'activation des « death receptors » par des ligands extracellulaires (figure 2)<sup>161</sup>. L'engagement des ligands engendre l'apoptose au niveau de la cellule cible (figure 2)<sup>161</sup>.

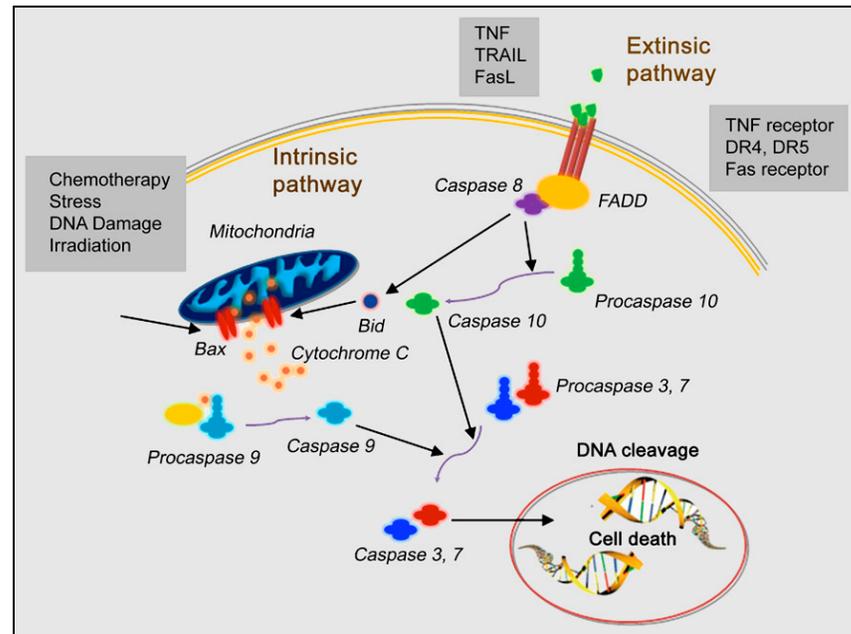
La voie intrinsèque ou voie mitochondriale médie l'apoptose en réponse à des stimuli comme l'irradiation aux ultra-violets, des drogues chimiothérapeutiques ainsi que le manque de facteurs de croissance nécessaires et de nutriments pour la survie cellulaire (figure 2)<sup>161,162</sup>.

La voie cytotoxique perforine/GrzB est utilisée par les lymphocytes T cytotoxiques afin de tuer leurs cibles en relarguant le contenu de leurs granules dans la synapse immunologique créée entre la cellule cytotoxique et la cellule cible (figure 3).

Le point commun des trois voies est l'activation de protéases spécifiques nommées Protéases Cystéine Acide-Aspartique-Spécifique ou caspases (figures 2 et 3)<sup>162</sup>.

Comme plusieurs autres protéases, les caspases sont synthétisées sous forme de pro-caspases inactives, car leur domaine catalytique est inhibé par des pro-domaines adjacents (figure 2)<sup>163</sup>. Les caspases sont classées en deux groupes, les caspases initiatrices qui clivent et activent les autres caspases et les caspases effectrices qui initient les changements cellulaires associés à l'apoptose<sup>161,163</sup>. La voie extrinsèque utilise la caspase initiatrice,

caspase 8, alors que la voie intrinsèque et la voie cytotoxique se servent de la caspase 9 (figure 2)<sup>161,163</sup>. Les trois voies utilisent les caspases effectrices 3, 6 et 7 (figures 2 et 3)<sup>163</sup>. Ces dernières clivent une panoplie de protéines qui sont essentielles à l'intégrité cellulaire et qui activeront des enzymes induisant la mort de la cellule (figures 2 et 3)<sup>161,163</sup>.



**Figure 2 : Schéma des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque.** La voie apoptotique extrinsèque est déclenchée par l'activation des « death receptors » par des ligands extracellulaires, tels que le TNF, le TRAIL et le FASL. La seconde voie est la voie intrinsèque, qui médie l'apoptose de la cellule en réponse à des stimuli, tels que la chimiothérapie, la famine, un dommage à l'ADN et l'irradiation. L'étape critique de la voie intrinsèque est la relâche du cytochrome *c* de la mitochondrie. L'aspect commun des deux voies est l'activation des caspases qui mène au clivage de l'ADN et à la mort de la cellule. Tiré de Niu, G. *et al.* J Nucl. Med. (2010)<sup>161</sup>

L'apoptose peut aussi se produire par des voies indépendantes des caspases<sup>164</sup>. Ces voies ne sont pas très bien caractérisées<sup>164</sup>. Quelques protéines relâchées par la mitochondrie peuvent entraîner une apoptose par des mécanismes peu connus<sup>164</sup>. L'apoptose indépendante des caspases peut aussi être engendrée par des stimuli causant la perméabilisation de la membrane lysosomiale (LMP) qui relâchera les protéases cathepsines<sup>164</sup>.

### 1.4.7.3 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est impliquée dans plusieurs fonctions du système immunitaire. L'activation de la caspase 8 est l'étape critique de cette voie et débute par le recrutement de la pro-caspase 8 au « death receptor » activé (figure 2)<sup>161,165</sup>. Les « death receptors » sont des membres de la superfamille des récepteurs TNF mais se distinguent des autres récepteurs de cette famille par leur domaine conservé « death domain (DD) » dans la région cytoplasmique du récepteur (figure 2)<sup>160,161,165</sup>. Les « death receptors » exprimés au niveau des cellules du système immunitaire les plus caractérisées, sont le Fas (CD95 ou Apo-1) ainsi que le TRAIL-R1 (« death receptor 4 », DR4) et le TRAIL-R2 (DR5) (figure 2)<sup>160,161,164</sup>. Il existe aussi une autre voie apoptotique qui est induite par « cross-linking » du TNF et du TNFR type I<sup>160,161</sup>.

Les cellules T et NKs expriment le ligand Fas (FasL ou CD178) alors que les cellules cibles expriment Fas, ce qui les rend susceptibles à l'apoptose médiée par cette voie<sup>160,165</sup>. La mort cellulaire médiée par Fas-FasL a lieu dans plusieurs contextes, incluant la protection des sites privilégiées immunologiques et la régulation ainsi que la terminaison des réponses immunitaires<sup>165</sup>.

Les cellules T périphériques activées par stimulation antigénique prolifèrent et produisent des cytokines, notamment l'IL-2<sup>165</sup>. Suite à une stimulation, les cellules T augmentent l'expression de deux protéines de surface impliquées dans l'induction de l'apoptose, soit Fas et FasL<sup>165</sup>.

### 1.4.7.4 Fas-ligand Fas

La première étape dans l'apoptose médiée par Fas est la liaison du FasL, qui résulte en sa trimérisation et le recrutement du « Fas associated death domain » (FADD)<sup>163</sup>. Ensuite, lorsque FADD est trimérisé, il y a recrutement de la procaspase 8 ou 10, qui s'autoprotéolysent pour être activées<sup>163</sup>. L'assemblage de ces composants forme le *death-inducing signaling complex* (DISC)<sup>163</sup>. La caspase 8 interagit avec les procaspases 3, 6 et 7, et par un processus de transprotéolyse, il y a activation de ces caspases (figure 2)<sup>163</sup>. Finalement, ces dernières causent un dommage à l'ADN (figure 2)<sup>160</sup>. La caspase 8 peut

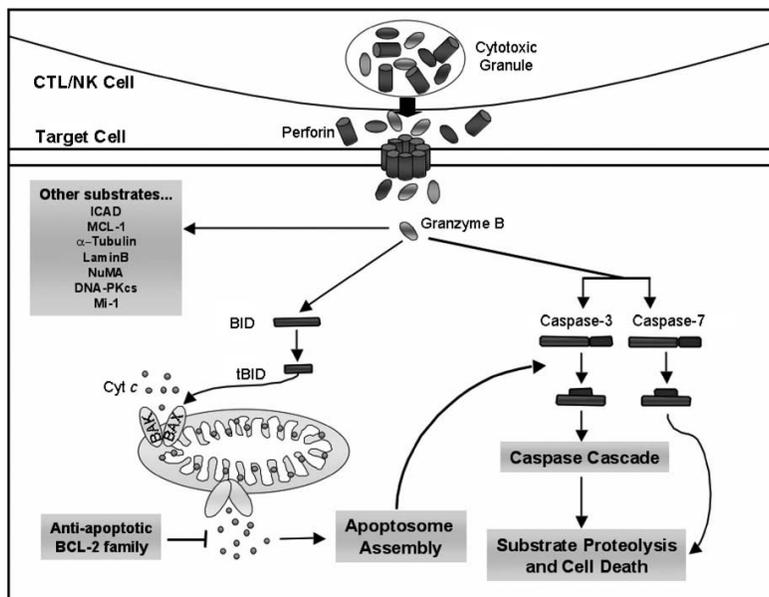
aussi hydrolyzer BID, qui cause un dommage à la membrane mitochondriale externe et induit la relâche du cytochrome *c* (figure 2)<sup>166,167</sup>.

#### **1.4.7.5 TRAIL**

Une voie similaire mais distincte à la voie Fas-FasL utilise le TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), aussi connu comme Apo-2L<sup>168</sup>. TRAIL interagit avec deux récepteurs, soit le TRAIL-R1 (DR4) et le TRAIL-R2 (DR5)<sup>169,170</sup>. Une fois la liaison formée avec les récepteurs, ces derniers se lient aux protéines FADD par leur portion cytoplasmique<sup>160</sup>. Ensuite les protéines FADD recrutent la procaspase 8 qui est activée par le DISC<sup>171,172</sup>. La caspase 8 est capable de déclencher l'apoptose en interagissant soit avec les procaspases 3, 6 et 7 ou par le clivage de BID, comme mentionné ci-dessus<sup>160</sup>.

#### **1.4.7.6 Granzyme B et perforine**

En plus des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque, il existe aussi la voie utilisée par les cellules cytotoxiques. La voie principale utilisée par les lymphocytes T cytotoxiques est celle des granules calcium- ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dépendantes. Ces granules cytotoxiques, qui sont des lysosomes modifiées, comprennent trois différents types de protéines effectrices, soit la perforine, la GrzB ainsi que la granulysine<sup>160</sup>. Ces protéines sont relarguées dans la synapse immunologique créée entre ces cellules T cytotoxiques et la cellule cible (figure 3)<sup>173</sup>.



**Figure 3 : Voies de la mort cellulaire médiée par la GrzB.** La GrzB entre dans la cellule par un mécanisme dépendant de la perforine, les détails demeurent nébuleux. Une fois dans la cellule cible, la GrzB promouvoit la mort par deux voies principales, soit par la perméabilisation mitochondriale BID-dépendante ou par une activation directe des caspases. La protéolyse médiée par la GrzB de la protéine BID expose un signal de myristoylation à cette protéine. Ensuite, elle se rend à la mitochondrie où elle induit l'oligomérisation de BAX et/ou BAK dans la membrane externe de la mitochondrie. Ceci facilite la relâche du cytochrome *c* dans le cytosol et l'assemblage de l'apoptosome qui active subséquemment la caspase-9 et ensuite la cascade de caspases.

La GrzB peut aussi agir directement sur les caspases effectrices -3 et -7. L'activation directe de ces caspases mène à leur activation et au clivage d'une panoplie de substrats qui induira la mort cellulaire. La GrzB clive ICAD, l'inhibiteur de la DNase, pour que CAD dégrade l'ADN. Il a été démontré que cette granzyme clive plusieurs autres protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité nucléaire (Lamin B), dans la protection contre la mort cellulaire (MCL-1), la réparation de l'ADN (DNA-PKcs), la dynamique des microtubules ( $\alpha$ -tubulin) et des autoantigènes (NUMA, U1-70kD). Tiré de Martin S.J. *et al.* Cell Death and Differentiation (2008)<sup>174</sup>.

Dans les cellules T, les granules ne sont synthétisés que suite à l'activation de la cellule par un antigène spécifique contrairement aux cellules NKs qui les expriment constitutivement<sup>175,176</sup>. Lorsque la cellule T reconnaît sa cible, elle débute rapidement sa polarisation du « microtubule organizing center » (MTOC) vers la synapse immunologique et ses granules suivent ces microtubules dans la direction de la membrane plasmique<sup>177-179</sup>. Le rôle de la perforine n'est pas clairement élucidé. Cette protéine a été purifiée des granules en 1985<sup>180</sup>. Depuis, sa fonction est au cœur de plusieurs débats. Sa structure, sa

fonction, son mécanisme d'action et son synergisme avec les autres molécules demeurent inconnus<sup>164,181</sup>.

L'hypothèse la plus acceptée est que la perforine se retrouve dans les granules lytiques sous forme de monomère soluble<sup>182</sup>. Suite au contact de la cellule effectrice et la cible, la perforine est relâchée par exocytose, change de conformation et pénètre la membrane de la cible (figure 3)<sup>183</sup>. Une fois ancrée, la perforine débute sa polymérisation en présence du  $Ca^{2+}$  afin de former des pores cylindriques (figure 3)<sup>184,185</sup>. Les pores de perforine servent d'entrée aux granzymes et granulysines dans la membrane cellulaire de la cible et permettent donc un échange ionique, ce qui crée un débalancement osmotique et par conséquent, la mort de la cible (figure 3)<sup>184</sup>. De plus, les protéines perforines sont internalisées au même moment que la GrzB pour qu'elles puissent former des pores dans les vésicules<sup>184</sup>. Les GrzB se retrouvent donc dans le cytoplasme de la cellule (figure 3)<sup>184</sup>. Malgré le fait que cette hypothèse soit la plus acceptée, de faibles évidences expérimentales supporte la formation des pores<sup>160</sup>.

Certaines études démontrent que le récepteur mannose-6-phosphate est utilisé par GrzB pour entrer dans la cellule et que cette entrée est indépendante de la perforine, alors que d'autres prouvent que tout se fait par lien électrostatique de la GrzB à la surface de la membrane<sup>186</sup>. Il a aussi été proposé que les GrzB entrent dans la cellule par des endosomes et que la perforine ne serve qu'à permettre l'entrée de la GrzB dans le cytosol, car la perforine n'a jamais été détecté dans le cytosol<sup>164</sup>. La présence de la perforine est connue comme étant nécessaire pour la cytolyse mais non pour l'entrée des protéases dans la cible<sup>187</sup>.

Le rôle de la serglycine, une granule protéglycane, a aussi été décrit pour la libération de la GrzB<sup>188,189</sup>. La serglycine se lierait à la perforine et la granzyme pour former un complexe qui traverse la membrane cellulaire de la cible sans formation de pore<sup>189</sup>. La serglycine délivrerait la GrzB à la cellule cible où elle subit un transfert électrostatique de la protéoglycane à la membrane cellulaire<sup>189</sup>. Une étude récente remet en question le rôle de la serglycine comme étant un agent livreur et suggère que son rôle serait associé à la maturation de la GrzB et de son entreposage<sup>190</sup>.

Une fois dans le cytosol, les granzymes déclenchent l'apoptose dans la cellule cible en activant les caspases (figure 3)<sup>160</sup>. La GrzB clive et active la caspase-3, une cystéine protéase qui coupe les résidus de l'acide aspartique (figure 3)<sup>160,174</sup>. Caspase-3 active une cascade protéolytique de caspases (figure 3), qui activent éventuellement la *caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD) en clivant une protéine inhibitrice (ICAD) qui lie et inactive CAD<sup>160</sup>. Cette nucléase est l'enzyme qui dégrade l'ADN. La GrzB active aussi d'autres voies de mort cellulaire. Une protéine cible importante est BID (« BH3-interacting domain death agonist protein ») (figure 3)<sup>160,174</sup>. Lorsque BID est clivé, soit directement par la GrzB ou indirectement par la caspase-3, la membrane externe de la mitochondrie n'est plus étanche et cause la relâche des molécules pro-apoptotiques présentes dans l'espace intermembranaire, comme le cytochrome *c* (figure 3)<sup>160,174</sup>.

## **1.5 Hypothèse et objectifs de recherche**

### **1.5.1 Hypothèse :**

Il a été suggéré que les cellules T DN, dans la souris, peuvent jouer un rôle de cellules régulatrices tant dans les maladies auto-immunes (diabète) que dans la prévention de la GvH. De plus, cet effet est spécifique d'un antigène lorsque ces cellules sont préalablement activées en présence de ce dernier.

Notre hypothèse est que ces propriétés fonctionnelles sont également partagées par les cellules T DN humaines et que par conséquent, les cellules T DN pourraient être utilisées comme thérapie cellulaire de la GvH.

### **1.5.2 Objectif principal :**

Étudier le rôle immunomodulateur et la fonctionnalité des cellules T DN isolées et amplifiées à partir de sang périphérique humain.

### **1.5.3 Objectifs spécifiques :**

- Isolation et amplification des cellules T DN à partir de sang périphérique humain.

- Vérifier la fonctionnalité des cellules T DN en évaluant leurs propriétés immunorégulatrices, leur capacité d'inhiber l'action des cellules T syngéniques stimulées contre le même alloantigène.
  - o Étudier le ou les mécanismes impliqués dans leur activité inhibitrice.

## **Chapitre 2 : Méthodologie**

### **2.1. Obtention des PBMCs humains de donneurs sains**

Le prélèvement du sang périphérique d'un donneur sain se fait par des infirmières du CHU Sainte-Justine (Consentement # 2602, approuvé par le comité d'éthique du CHU Ste-Justine). Le nombre de millilitres (mL) prélevé est soit 30 mL pour la purification de cellules T DN, soit de 10 mL lorsqu'environ 15 millions de PBMCs représentant les donneurs A, B et C de la MLR sont requis. Le sang est dilué 1 :1 dans du PBS (D-PBS, Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et déposé doucement sur le Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) (ratio 1 Ficoll : 2 sang dilué). Le tout est centrifugé à 400g pour une durée de 30 minutes, et se termine sans freins. L'interface de PBMCs est récolté et lavé avec du PBS. Les cellules sont colorées au bleu de trypan (Sigma) afin d'évaluer leur viabilité et leur décompte à l'hématimètre.

### **2.2. Purification des cellules T DN**

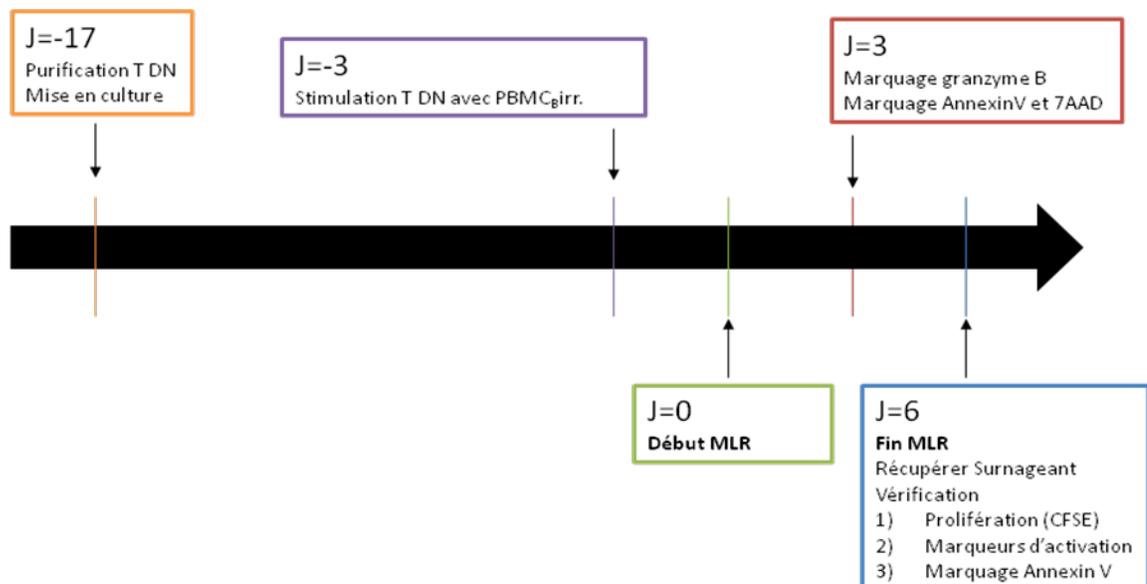
Les PBMCs sont marquées avec le cocktail d'anticorps du Pan T cell kit comprenant anti-CD14 humain, anti-CD16 humain, anti-CD19 humain, anti-CD36 humain, anti-CD56 humain, anti-123 humain et anti-235a humain, pour une sélection négative (Miltenyi Biotec, Allemagne). Suite au marquage, les cellules sont passées dans une colonne MS (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les cellules T CD3<sup>+</sup> se retrouvent dans la fraction non-retenue qui sera ensuite marquée avec des anticorps anti-CD4 humain et anti-CD8 humain (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) couplées au PE et des billes anti-PE pour une seconde sélection négative (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les cellules sont ensuite passées dans une colonne MS (Miltenyi Biotec, Allemagne) qui permettra le préenrichissement de cellules T DN. Cette fraction sera ensuite triée au cytomètre en flux. Des aliquots sont nécessaires à chacune des étapes de sélection afin de vérifier la pureté au cytomètre en flux par la suite.

## 2.3 Culture cellulaire

Suite à la purification des cellules T DN du sang périphérique humain, ces cellules sont mises en culture dans une plaque de 96 puits à fond rond (Sarstedt, Allemagne) enrobées avec des anticorps anti-CD3 (Clone : OKT3, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (eBiosciences, USA) et anti-CD28 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (BD Pharmingen) pour 12 heures à 4°C. Les cellules sont mises en culture à une concentration maximale de 100 000 cellules/puit avec l'IL-2 (30 U/mL) (Chiron Corp) et l'IL-4 (30 U/mL) (BD Biosciences, San Diego, CA) dans le milieu RPMI + glutamine (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, USA) avec 10% de sérum humain type AB (PAA Laboratories, Austria). Les cellules sont comptées à l'hématimètre avec une coloration au bleu de trypan afin d'exclure les cellules mortes et leur milieu est changé 3 fois par semaine. Lorsque le nombre de cellules augmente, soit plus de 500 000, les cellules sont ensuite transférées dans une plaque de 24 puits à fond plat (Sarstedt, Allemagne) et finalement dans une plaque de 6 puits à fond plat (Sarstedt, Allemagne).

## 2.4 Réaction lymphocytaire mixte

Les cellules T DN sont purifiées à partir du sang périphérique frais de donneurs sains (donneur A) au J-17 (section 2.2 et figure 4).



**Figure 4-Schéma temporel du déroulement de la réaction lymphocytaire mixte (MLR).** Au J-17, les cellules T DN du donneur A ( $\text{DN}_A$ ) sont purifiées à partir de sang périphérique frais et les cellules sont mises en culture pendant quatorze jours. Au J-3, il y a stimulation des cellules T  $\text{DN}_A$  par les PBMCs irradiées du

donneur B (PBMC<sub>B</sub>irr.) pendant trois jours. Au J0, la MLR est débutée. Au J3, il y a la récolte des cellules afin de mesurer l'expression intracellulaire de la GrzB au niveau des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées par les PBMC<sub>B</sub>irr. et la mesure de l'induction de l'apoptose des cellules effectrices par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées. Au J6, il y a récupération du surnageant afin de doser les cytokines du milieu et il y a la mesure de la prolifération, des marqueurs d'activation ainsi que de l'induction de l'apoptose des cellules effectrices.

Trois jours avant le début de la MLR (J-3), 10 mL de sang périphérique est prélevé du donneur B (PBMC<sub>B</sub>) afin d'effectuer la stimulation des cellules T DN du donneur A (DN<sub>A</sub>) (figure 4). Les PBMC<sub>B</sub> sont isolées comme décrit ci-dessus (section 2.1). Nous faisons un décompte à l'hématimètre avec coloration au bleu de trypan afin d'exclure les cellules mortes. Ensuite, les PBMC<sub>B</sub> sont irradiées à 5 Gy dans l'irradiateur au Cobalt 60. Les cellules sont lavées avec du milieu complet et mises en présence des cellules T DN<sub>A</sub> à un ratio 1 :1 ( $2 \times 10^4$  cellules) pendant trois jours (figure 4). En parallèle, des cellules non-stimulées sont aussi maintenues en culture.

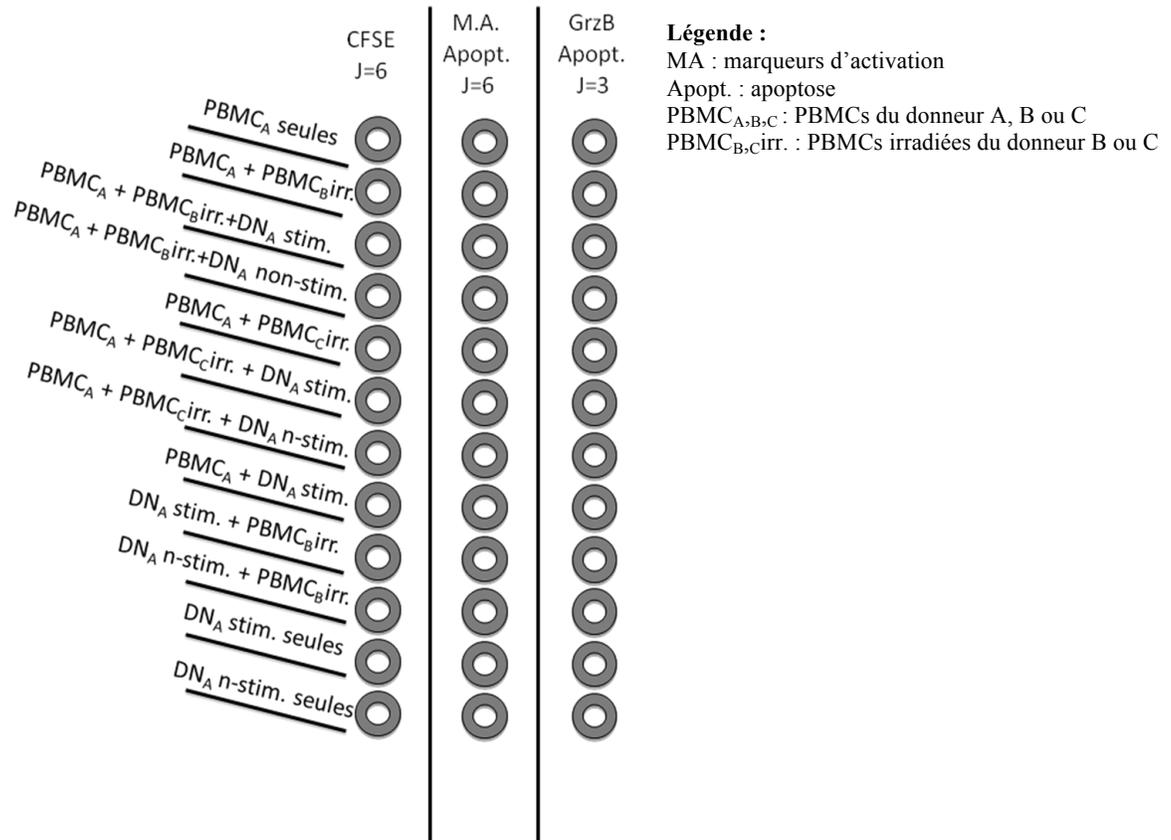
Au J0, soit la journée du début de la MLR, 10 mL des donneurs A, B et C est prélevé afin d'isoler les PBMCs (figure 4). Les effecteurs, soit une fraction des PBMC<sub>A</sub>, sont marquées au CFSE (Invitrogen, CellTrace<sup>TM</sup>, CFSE Proliferation Kit, Canada). Des aliquots de CFSE dilués sont gardés dans du PBS et congelés à -80°C. Les cellules effectrices sont resuspendues dans 1 mL de PBS auquel on rajoute le contenu de l'aliquot. Le marquage se fait pendant 7 minutes dans le noir et on agite le tube à toutes les 2 minutes. Ensuite, le marquage est arrêté avec l'ajout de 1mL de FBS frais et les cellules sont mises une minute sur glace avant d'être lavées 2 fois avec du milieu complet.

La totalité des PBMC<sub>B</sub> et des PBMC<sub>C</sub> sont irradiées à 5 Gy dans un irradiateur au Cobalt 60 pour ensuite être lavés avec du milieu complet.

Finalement, les cellules sont comptées et mises dans les puits correspondants selon leur condition respective. Nous mettons les cellules selon le ratio suivant : 1 DN pour 4 PBMCs. Spécifiquement,  $5 \times 10^4$  cellules T DN sont mises en présence de  $2 \times 10^5$  PBMCs par puit.

Il y a 12 conditions et chaque condition occupe 3 puits (figure 5). Le premier puit est consacré à la vérification de la prolifération au CFSE au J6, le second puit est pour la

vérification des marqueurs d'activation et d'apoptose au J6 et finalement le troisième puit est nécessaire pour la vérification de l'expression de la GrzB ainsi que l'apoptose au J3 (figure 5). Ces trois puits ne représentent pas des triplicatas car chaque puit est utilisé pour des fins d'analyses différentes, soit la prolifération (J6), les marqueurs d'activation (J6) et d'apoptose (J3 et J6) ainsi que la GrzB (J3) (figure 5).



**Figure 5- Schéma des conditions effectuées durant la réaction lymphocytaire mixte (MLR).** Représentation des conditions effectuées durant la MLR. Les puits de la première colonne contiennent les cellules marquées au CFSE afin de mesurer la prolifération au niveau des cellules effectrices données. L'apoptose et les marqueurs d'activation seront mesurés au niveau des cellules de la deuxième colonne au J6. Le marquage intracellulaire de la GrzB et l'apoptose des cellules de la troisième colonne seront évaluées au J3.

Les figures 8 à 18, illustrant les données des MLR, représentent les résultats obtenus après trois expériences différentes (n=3). Ainsi, les pourcentages illustrés représentent la moyenne des pourcentages obtenus pour chaque condition dans les trois expériences différentes.

Au J3, les cellules de la troisième colonne de puits de chaque condition sont récupérées et divisées en deux. Une partie servira à la vérification de l'apoptose et l'autre sera utilisée pour la vérification de l'expression de la GrzB de façon intracellulaire (figures 4 et 5).

Au J6, les cellules des deux autres colonnes de puits sont récupérées afin de vérifier la prolifération et les marqueurs d'activation ainsi que l'apoptose (figures 4 et 5).

## 2.5. Cytométrie en flux

La fraction pré-enrichie de DN sera marquée avec les anticorps anti-CD3 humain-APC, anti-TCR $\alpha\beta$  humain-FITC, anti-CD4 humain/CD8 humain-PE et le 7AAD, afin d'exclure les cellules mortes (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Le tri sélectionnera les cellules TCR $\alpha\beta^+$ CD3 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 7AAD $^-$ . Le taux de pureté est habituellement > 99%.

Les anticorps suivants sont utilisés pour observer le taux de pureté des cellules T DN une semaine après mise en culture : anti-TCR $\alpha\beta$  humain-FITC, anti-CD4 humain-APC, anti-CD8 humain-PE, anti-CD5 humain-APC, anti-CD3 humain-FITC et anti-CD56 humain-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Les anticorps suivants sont utilisés pour le phénotypage des cellules T DN : anti-TCR $\alpha\beta$  humain-PE (Immunotech, Beckman Coulter, Streetsville, ON, Canada), anti-CD56 humain-PE, anti-CD4 humain/CD8 humain-PerCP-Cy5.5, TCR $\alpha\beta$  humain-FITC, anti-CD3 humain-APC, anti-CD5 humain-APC, anti-CD25 humain-APC, anti-CD31 humain-APC, anti-CD127 humain-APC, anti-CD69 humain-APC, anti-CD45RA humain-APC et anti-CD45RO humain-APC PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

En ce qui concerne la MLR, les anticorps suivants seront utilisés afin de vérifier l'apoptose, la prolifération, les marqueurs d'activation ainsi que l'expression de la GrzB: anti-CD3 humain-PeCy7, anti-CD4 humain-APC, anti-CD8 humain-PE, anti-HLA-DR humain-FITC, anti-CD69 humain- PerCP-Cy5.5, anti-CD25 humain-PE, anti-CD4 humain-FITC, anti-CD8 humain-APC, AnnexinV humain-FITC (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), anti-GrzB humain-Alexa Fluor 647, 7AAD (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

Le marquage intracellulaire effectué pour la vérification de la GrzB au niveau des cellules T DN est effectué comme suit: les cellules sont marquées à la surface pour distinguer les différentes populations cellulaires. Ensuite, les cellules sont lavées, fixées et perméabilisées avec la solution de fixation et de perméabilisation Cytotfix/Cytoperm 1X (BD Biosciences, USA) pendant 20 minutes. Les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de tampon Perm/Wash 1X (BD Biosciences, USA) pour être marquées de façon intracellulaire par la suite, soit avec l'anticorps anti-GrzB humain-Alexa Fluor 647.

La vérification de l'apoptose se fait après un marquage de surface habituel. Nous mettons 5  $\mu$ L d'Annexin V-FITC (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et 5  $\mu$ L de 7AAD dans chaque tube pendant 15 minutes dans le noir à température pièce. Nous rajoutons 400  $\mu$ L d'Annexin Binding Buffer 1X (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) avant de passer au cytomètre en flux.

Lorsque les cellules sont resuspendues dans du PBS+2% FBS et mises en présence des anticorps, elles sont incubées pendant 30 minutes à 4°C dans le noir. Elles sont ensuite lavées et resuspendues dans du PBS+2% FBS, dans un volume de 400 $\mu$ L. Avant de lire les échantillons au cytomètre en flux, des billes Countbright™ (Molecular Probes Inc., Invitrogen, Eugene, USA) sont rajoutées à chacun des tubes afin de pouvoir effectuer le décompte absolu des échantillons analysés.

L'analyse des échantillons se fait avec le cytomètre en flux FACS Aria™ (BD Biosciences, USA) et les données sont analysées avec le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences, USA).

Tous nos contrôles ont été effectués par rapport à l'autofluorescence et non par contrôle isotypique (Résultats validés par les laboratoires du Dr. Élie Haddad, du Dre. Françoise LeDeist et du Dre. Sylvie Lesage).

## **2.6 Analyse Statistique**

Les tests statistiques ont été calculés avec le test Mann-Whitney (*t* de Student non paramétrique) avec l'application de la correction de Bonferroni pour comparaisons

multiples (figures 8 à 17). Le seuil de significativité est 0.025 car le contrôle positif est toujours comparé à deux conditions, soit la condition en présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et des T DN<sub>A</sub> non-stimulées (figures 8 à 17). Le test statistique de la figure 18A a été calculé par le test Mann-Whitney avec un seuil de significativité de 0.05 car nous avons comparé la condition des T DN<sub>A</sub> stimulées à la condition des T DN<sub>A</sub> non-stimulées. L'analyse statistique a été validée par Dre. Marie-Hélène Roy-Gagnon, chercheuse au CHU Ste-Justine.

Les valeurs indiquées sur les graphiques représentent les moyennes des données +/- SEM. Le logiciel GraphPadPrism 5.0c a été utilisé pour l'analyse des statistiques (Prism 5 pour Mac OS X, GraphPad Softwares Inc., 2010).

## **Chapitre 3 : Résultats**

### **3.1 Isolation et amplification des cellules T doubles-négatives**

Afin de pouvoir caractériser et étudier le rôle des cellules T DN régulatrices, ces dernières sont isolées à partir de sang périphérique frais de donneurs sains (consentement # 2602, approuvé par le comité d'éthique du CHU Ste-Justine). Les cellules T DN représentent 0.06% des PBMCs totaux (n=14), ce qui correspond à la littérature<sup>111</sup>.

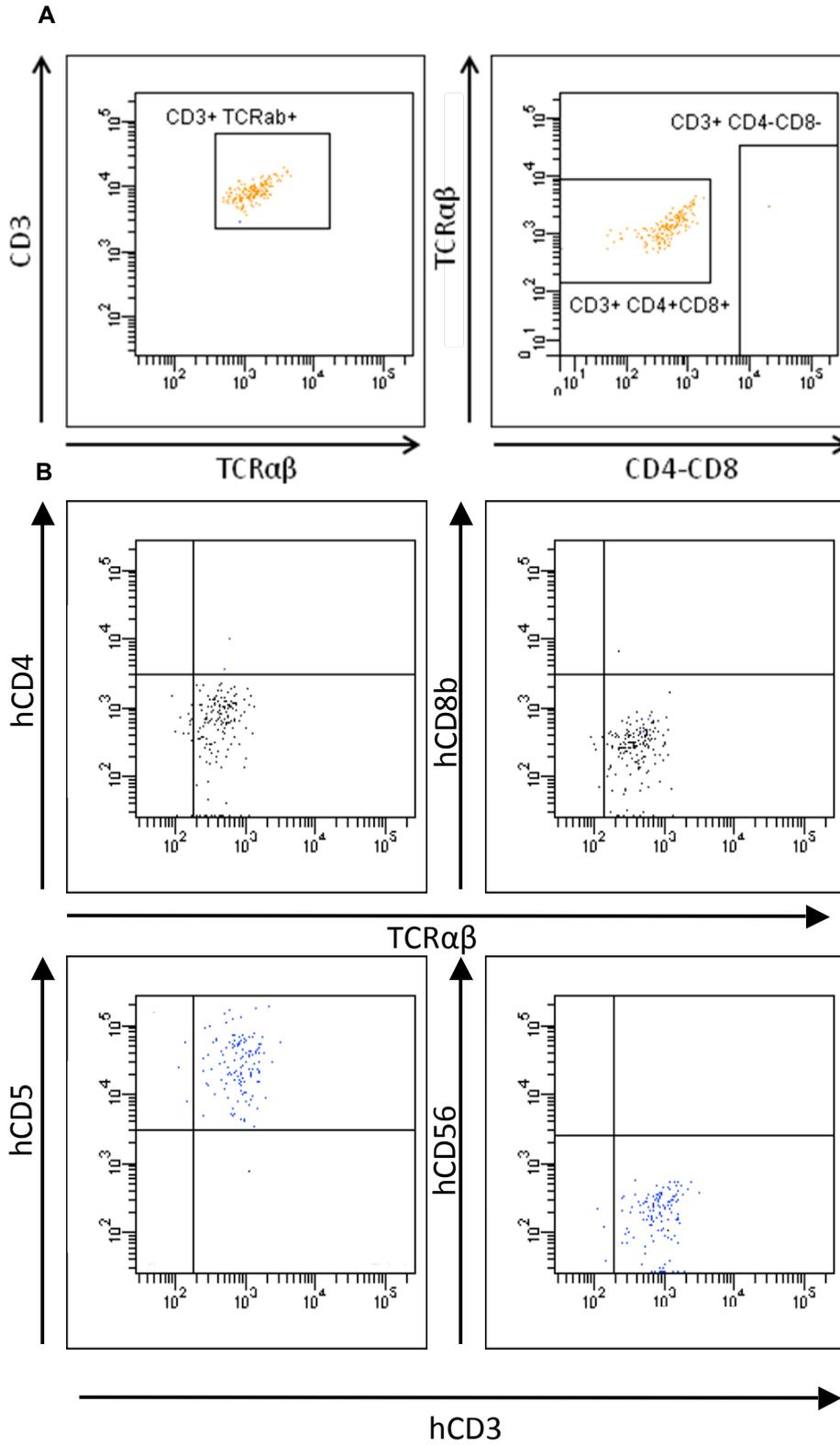
Nous isolons premièrement les cellules T CD3<sup>+</sup> par sélection négative. Ensuite, il y a pré-enrichissement des cellules T DN en éliminant les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par sélection négative. Par la suite, les cellules T DN pré-enrichies sont marquées (CD4-PE, CD8-PE, CD3-APC, TCRαβ-FITC, 7AAD) pour être triées au cytomètre en flux. Nous obtenons un taux de pureté > 99%, comme démontré à la figure 6A (n=14).

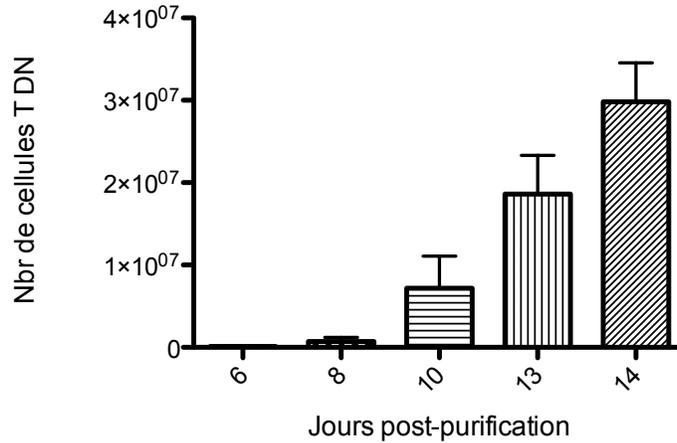
Suite à l'isolation, les cellules sont mises en culture et comptées après une semaine et à tous les changements de milieu qui se font trois fois par semaine, et ce, jusqu'à 14 jours de culture. Nous obtenons une amplification d'un facteur de 10<sup>3</sup>, comme le démontre la figure 6B (n=9).

Les cellules sont marquées afin de vérifier leur pureté une semaine après avoir été mises en culture. Les cellules sont TCRαβ<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8β<sup>-</sup> et CD56<sup>-</sup> comme le démontre la figure 6C (n=9). La mesure de l'expression du TCRαβ, du CD3 ainsi que du CD5 sert à évaluer si les cellules sont des lymphocytes T<sup>191</sup>. Ensuite, les cellules sont des lymphocytes T DN car elles n'expriment pas le CD4 et le CD8β<sup>111</sup> (figure 6C). Finalement, le marqueur CD56 est exprimé à la surface des cellules NK ou des « Natural Killer T cells » (NKTs)<sup>146</sup>. Nous excluons la possibilité que les cellules T DN soient des cellules NK ou des NKT vu qu'elles n'expriment pas le CD56 (figure 6C). Si le taux de pureté diminue, les cellules sont de nouveau purifiées par billes anti-CD4 et anti-CD8 puis remises en culture.

Jusqu'à présent, dans la littérature, les cellules T DN amplifiées *in vitro* étaient isolées de splénocytes murins<sup>110,112,129,140,149,192</sup>. Récemment, l'équipe de Fischer K. *et al.* a purifié les cellules T DN à partir de sang périphérique humain et ont effectué des expériences sans les

mettre en culture pour des fins d'amplification<sup>111</sup>. Nous sommes les premiers à montrer que l'on peut amplifier les cellules T DN humaines *in vitro* après leur purification. Ceci nous permet d'effectuer des expériences étudiant leurs rôles et leurs fonctions *in vitro* à des temps différents.

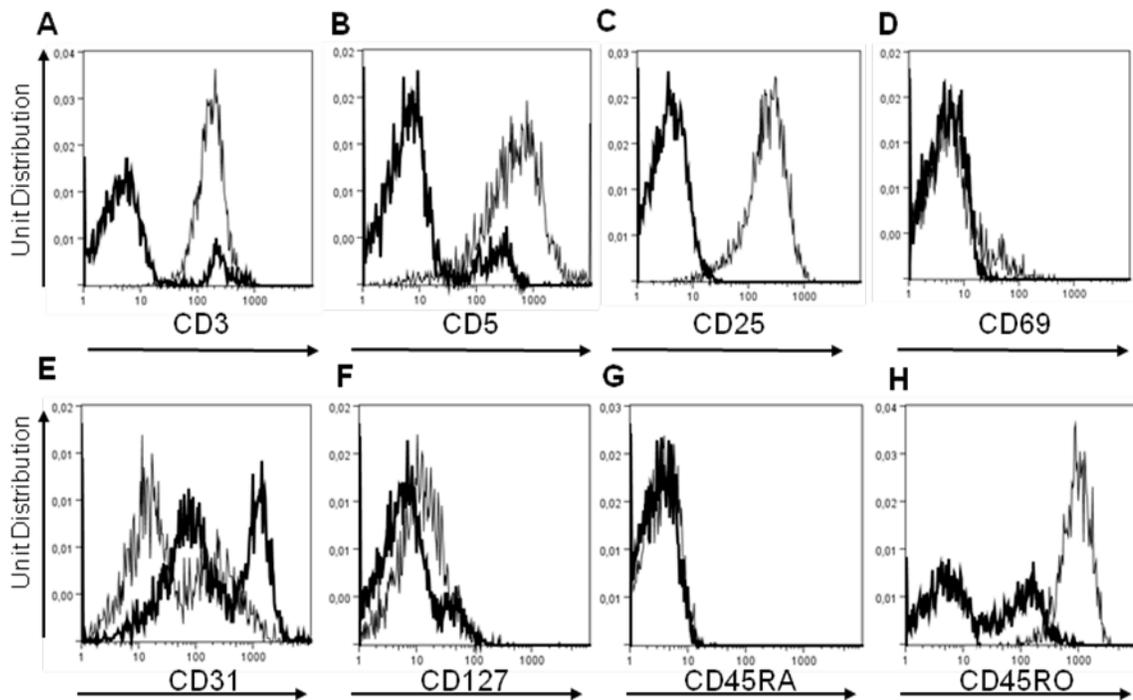




**Figure 6 -Isolation et amplification des cellules T doubles-négatives à partir de sang périphérique humain.** Tri des cellules T DN ayant comme phénotype  $CD3^+CD4^+CD8^-$  triées parmi les cellules  $CD3^+TCR\alpha\beta^+$  par cytométrie en flux (pureté > 99%) (Obtention de très peu de cellules après les tris) (n=14) (A). Taux de pureté maintenu après une semaine de culture. Les cellules demeurent  $CD4^+CD8\beta^-$   $CD5^+CD3^+CD56^-$  (B) (n=9). Amplification d'un facteur de  $10^3$  après une durée de 14 jours (C) (n=9).

### 3.2 Phénotypage des cellules T DN

Afin de vérifier le phénotype des cellules T DN humaines par rapport aux T DN murins caractérisées dans la littérature<sup>110-112,149</sup>, nous avons effectué leur phénotypage après une semaine de culture. Les marqueurs vérifiés sont CD3, CD5, CD25, CD69, CD31, CD127, CD45RA et CD45RO (figure 7). L'expression des marqueurs au niveau des T DN a été comparée à des PBMCs frais.



**Figure 7- Phénotypage des cellules T doubles-négatives.** Les cellules T DN (trait fin) et les PBMCs frais (trait gras) ont été phénotypées avec les anticorps anti-CD3, anti-CD5, anti-CD25, anti-CD69, anti-CD31, anti-CD127, anti-CD45RA et anti-CD45RO. Phénotypage effectué après sept jours de culture dans une plaque de 96 puits à fond rond enrobés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 en présence d'IL-2 et d'IL-4. *Unit Distribution* représente le pourcentage de cellules dans chaque canal de fluorescence.

Comme nous le constatons à la Figure 7, les cellules T DN expriment nettement le CD3 (figure 7A), le CD5 (Figure 7B), le CD25 (figure 7C) et le CD45RO (figure 7H). Ceci correspond à la littérature car il s'agit de lymphocytes T, exprimant donc le CD3 et le CD5<sup>191</sup>. Les cellules T DN sont mises en culture avec de l'IL-2 et de l'IL-4. Ceci explique pourquoi elles expriment le CD25, qui est le récepteur de l'IL-2. Après avoir été cultivées en présence de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, les cellules T DN sont au stade effecteur après une semaine et expriment le CD45RO<sup>193</sup>.

Pour ce qui est du CD31, il n'y a qu'une partie des T DN qui l'exprime (figure 7E). Le CD31 est utilisé afin d'identifier des émigrants thymiques récents parmi les cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup><sup>194</sup>. Les cellules T DN ne sont pas CD45RA<sup>+</sup> donc elles ne peuvent pas être considérées comme des émigrants thymiques récents (figure 7G). Les cellules T DN n'expriment pas le CD69 (figure 7D) et le CD127 (figure 7F) en culture. Le marqueur CD69 est un marqueur d'activation précoce. Les cellules T DN sont mises en culture dans

des puits enrobés avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et en présence de l'IL-2 et l'IL-4. Cependant, le phénotypage a été effectué une semaine après l'activation initiale des cellules. Il est donc attendu que les cellules T DN n'expriment plus le CD69 car ce marqueur est exprimé sur les cellules T activées environ quatre heures après leur activation<sup>150</sup>. Au moment du phénotypage, les cellules sont au stade effecteur, donc il est attendu qu'elles n'expriment pas le CD127<sup>195</sup> et le CD45RA<sup>196</sup>.

### 3.3 Réaction lymphocytaire mixte (MLR)

#### 3.3.1. Prolifération

Afin d'étudier le rôle immunomodulateur des cellules T DN, nous avons effectué des MLRs avec des cellules effectrices et des cellules cibles. Le modèle murin de Li Zhang stipule que ces cellules sont immunosuppressives de façon spécifique aux antigènes exprimés à la surface des splénocytes avec lesquels les cellules T DN sont stimulées<sup>112</sup>.

De plus, l'équipe de Fischer K. *et al.* a aussi récemment démontré que les cellules T DN humaines, stimulées préalablement à un ratio de 1 DN (donneur A): 1 DC (donneur B) pendant douze heures, inhibent la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> (donneur B) après vingt-quatre heures d'incubation<sup>111</sup>.

Pour vérifier les propriétés immunosuppressives des cellules T DN humaines dans le cadre d'une MLR, nous les avons stimulées pendant trois jours avec les PBMCs du donneur B irradiées (PBMC<sub>B</sub>irr.) à 5 Gy. Nous avons aussi maintenu en culture des cellules T DN non-stimulées par les PBMCs du donneur B.

Après trois jours, nous débutons la MLR où, en plus des contrôles, les effecteurs et les cellules cibles sont étudiés dans de différentes conditions afin de vérifier à la fois le rôle des T DN et leur spécificité (voir figure 5 et tableau I). Ainsi, pour vérifier leur inhibition spécifique, nous étudions l'action des T DN en présence d'un troisième donneur, soit le donneur C.

**Tableau I : Prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> selon les conditions étudiées**

Groupes	Conditions Étudiées	Prolifération T CD4 <sup>+</sup> et T CD8 <sup>+</sup>	Légende :
	PBMC <sub>A</sub> seuls	-	- : aucune prolifération
PBMC <sub>A</sub> versus PBMC <sub>B</sub>	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>B</sub> irr.	+++	+ : prolifération faible
	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>B</sub> irr. + DN <sub>A</sub> stimulées	+	++ : prolifération modérée
	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>B</sub> irr. + DN <sub>A</sub> non-stimulées	++	+++ : forte prolifération
PBMC <sub>A</sub> versus PBMC <sub>C</sub>	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>C</sub> irr.	+++	
	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>C</sub> irr. + DN <sub>A</sub> stimulées	++	
	PBMC <sub>A</sub> + PBMC <sub>C</sub> irr. + DN <sub>A</sub> non-stimulées	+	
	DN <sub>A</sub> stimulées + PBMC <sub>B</sub> irr.	-	
	DN <sub>A</sub> non-stimulées + PBMC <sub>B</sub> irr.	-	
	PBMC <sub>A</sub> + DN <sub>A</sub>	-	
	DN <sub>A</sub> stimulées seules	-	
	DN <sub>A</sub> non-stimulées seules	-	

Prolifération observée au niveau de trois expériences (n=3).

Les cellules T DN proviennent du donneur A en tout temps (DN<sub>A</sub>). En premier lieu, les PBMCs du donneur A (PBMC<sub>A</sub>) sont les effecteurs en présence de leurs cibles : les PBMCs irradiées du donneur B (PBMC<sub>B</sub> irr.). Ensuite, les PBMC<sub>A</sub> sont les effecteurs en présence d'une autre cible : les PBMCs irradiées du donneur C (PBMC<sub>C</sub> irr.). Les cibles sont irradiées à 5 Gy, car nous étudions la réaction lymphocytaire mixte des effecteurs envers leurs cibles et non l'inverse. Donc, la présence des cibles est nécessaire pour que les effecteurs puissent réagir, sans pour autant qu'elles prolifèrent. Il y a finalement les conditions où les cellules T DN<sub>A</sub>, stimulées ou non-stimulées préalablement par les cellules irradiées du donneur B, sont mises en présence des PBMCs du donneur A avec les PBMCs irradiées du donneur B (PBMC<sub>A</sub>+PBMC<sub>B</sub> irr.+DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées) ou en présence du donneur A avec les PBMCs irradiées du donneur C (PBMC<sub>A</sub>+PBMC<sub>C</sub> irr.+DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées).

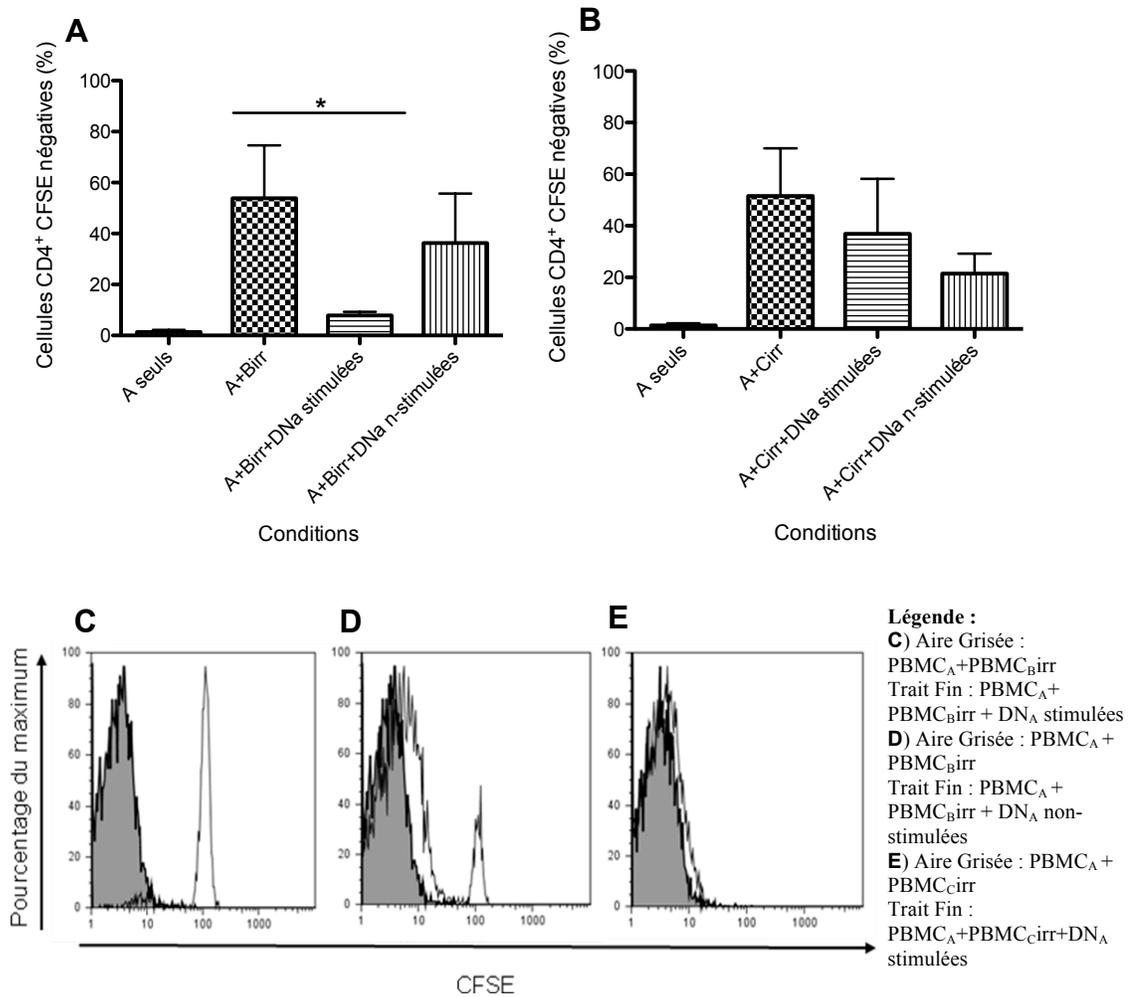
Nous étudions uniquement la prolifération, les marqueurs d'activation et l'apoptose des effecteurs. La prolifération est évaluée par la dilution du CFSE, utilisé pour marquer les effecteurs avant le début de la MLR, qui se déroule pendant 6 jours. Après 6 jours, nous vérifions la prolifération, les marqueurs d'activation ainsi que l'apoptose (aussi vérifiée après 3 jours) des sous-populations effectrices, soit T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> en absence des cellules T DN<sub>A</sub>. Par la suite, les propriétés des cellules T DN<sub>A</sub> sont vérifiées lorsqu'il y a la présence des T DN<sub>A</sub> stimulées par les cellules irradiées du donneur B ou non-stimulées dans les conditions respectives.

### 3.3.1.1. Prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices

Comme attendu, nous observons que les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> du donneur A ne prolifèrent pas lorsqu'elles sont mises en culture seules, alors qu'elles prolifèrent en présence des cellules cibles irradiées provenant du donneur B ou du donneur C, ce qui valide nos conditions expérimentales.

Nous constatons à la Figure 8A, une inhibition significative de la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement, par les PBMC<sub>B</sub> irradiées, en présence des cellules cibles du donneur B, comparativement au contrôle positif en absence des cellules T DN<sub>A</sub> (figure 8A et 8C,  $p < 0.025$ ). Cette inhibition n'a pas lieu lorsque les T DN<sub>A</sub> ne sont pas stimulées par les PBMC<sub>B</sub> irradiées (figure 8A et 8D). Ceci démontre que les T DN<sub>A</sub> ont une fonction immunosuppressive lorsqu'elles ont préalablement été exposées à des antigènes.

Lorsque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement par des PBMC<sub>B</sub> sont mises en culture avec les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> du donneur A et les cellules cibles irradiées du donneur C, il n'y a pas d'inhibition de la prolifération, comparativement au contrôle positif en absence des cellules T DN<sub>A</sub> (figure 8B et 8E). Cela démontre que les T DN<sub>A</sub> ont une fonction immunosuppressive qui est spécifique des antigènes vis à vis desquels elles ont été exposées. Ces cellules n'ont pas rencontré les antigènes présents à la surface des cellules du donneur C et donc ne réussissent pas à arrêter leur prolifération. De plus, les cellules T DN<sub>A</sub> non-stimulées spécifiquement n'inhibent pas significativement la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> (figure 8B).



**Figure 8- Prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> lors de la réaction lymphocytaire mixte (MLR).**  $2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, C et D, n=3) ou C (B et E, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> est mesurée par la dilution du CFSE. *Test Mann-Whitney avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples, \*p<0,025.*

Les résultats obtenus pour la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices confirment notre hypothèse. Les cellules T DN<sub>A</sub> possèdent des propriétés immunosuppressives spécifiques aux antigènes. Lorsque ces cellules sont préalablement stimulées par les cellules irradiées du donneur B, elles inhibent la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> du donneur A en présence des cellules cibles du donneur B. Ensuite, lorsqu'elles ne sont pas spécifiquement stimulées, il n'y a pas d'inhibition significative des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> du donneur

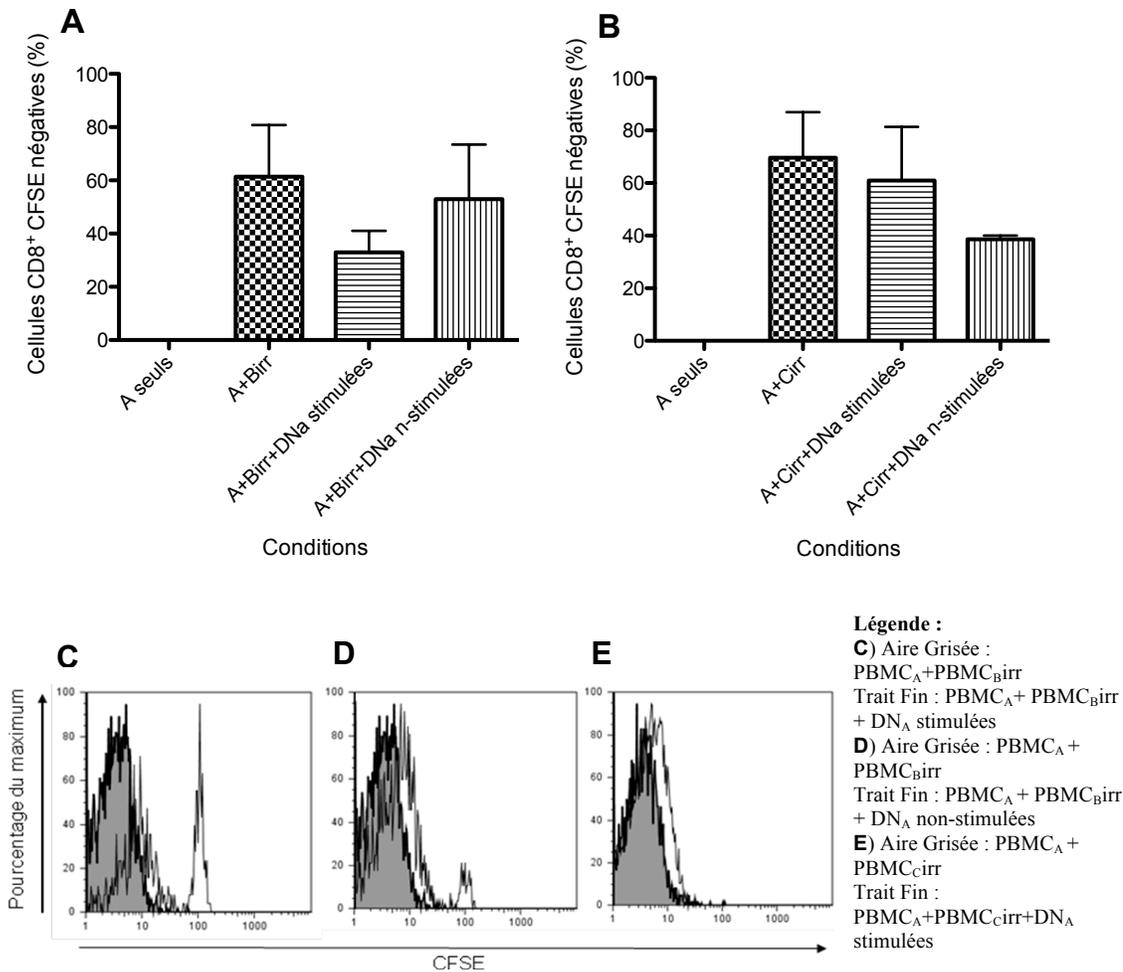
A en présence des cellules cibles du donneur B et C. Dans la littérature, le rôle immunomodulateur des cellules T DN murines sur des cellules T CD8<sup>+</sup> a été démontré par dans le modèle murin de Li Zhang<sup>112</sup>, et des cellules T DN humaines stimulées par des DCs allogéniques ont aussi inhibé la prolifération de cellules T CD8<sup>+</sup> allogéniques<sup>111</sup>. Par contre, il n'avait jamais été montré que les cellules T DN avaient une action inhibitrice sur des cellules T CD4<sup>+</sup>.

### 3.3.1.2. Prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices

Contrairement à ce que nous avons observé sur les cellules T CD4<sup>+</sup>, les cellules T DN<sub>A</sub>, stimulées spécifiquement par les cellules du donneur B, n'inhibent pas de façon significative la prolifération des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> provenant du donneur A en présence des cellules cibles irradiées du donneur B, comparativement au contrôle positif en absence des cellules T DN<sub>A</sub> (figure 9A et 9C, p=0.2). Nous observons une tendance (p = 0.2) et on pourrait émettre l'hypothèse que l'augmentation du nombre d'expériences nous permettrait d'observer une inhibition significative.

Il n'y a aucune inhibition des cellules T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> non-stimulées spécifiquement, en présence des cellules cibles irradiées du donneur B (figure 9A et 9C).

Afin de vérifier la spécificité aux antigènes des cellules T DN<sub>A</sub>, nous les avons aussi mis en présence des cellules cibles irradiées du donneur C, tout en étant stimulées préalablement par les cellules irradiées du donneur B (figure 9B). Il n'y a pas eu d'inhibition significative de la prolifération des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées spécifiquement, comparativement au contrôle positif en absence des cellules T DN<sub>A</sub> (figure 9B et 9E).



**Figure 9- Prolifération des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> lors de la réaction lymphocytaire mixte (MLR).**  $2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, C et D, n=3) ou C (B et E, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> est mesurée par la dilution du CFSE. *L'analyse par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

Ces résultats ne confirment pas notre hypothèse selon laquelle les cellules T DN humaines ont un rôle immunosuppresseur spécifique aux antigènes au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>. Si nous augmentons le nombre d'expériences effectuées, il se pourrait que l'inhibition devienne significative. Nos résultats ne confirment pas les résultats publiés dans la littérature car le modèle murin de Zhang *in vitro* stipule que les cellules T DN stimulées spécifiquement suppriment les cellules effectrices T CD8<sup>+</sup><sup>112</sup>. Dans ce modèle, il est suggéré que les cellules T DN murines agissent au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup> en leur envoyant un signal par la voie Fas-FasL ou par la voie perforine-GrzB<sup>110,112,192</sup>. De plus,

dans un modèle d'étude sur des cellules humaines, il a été montré que les cellules T DN humaines (donneur A) stimulées par les cellules DCs (donneur B) ont inhibé la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> (donneur B) après vingt-quatre heures de co-incubation<sup>111</sup>. Nous sommes la première équipe qui effectue une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles avec les cellules T DN humaines. Cependant, nos résultats ne confirment pas ceux de la littérature indiquant que les cellules T DN inhibent de façon spécifique à l'antigène la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup>.

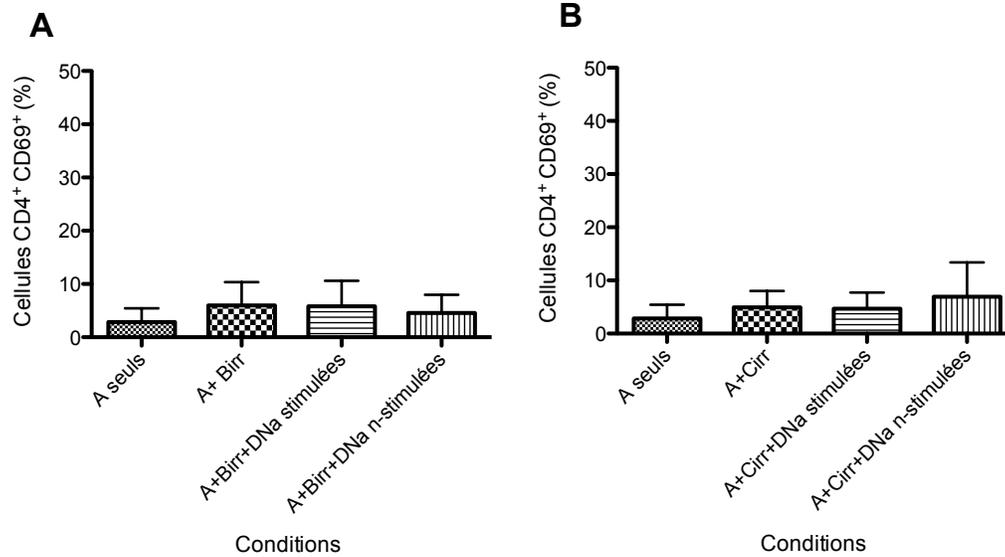
### **3.3.2 Marqueurs d'activation**

Après avoir évalué l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées en présence de leur cibles, nous avons regardé s'il y avait une modulation des marqueurs d'activation à la surface des cellules effectrices par les cellules T DN<sub>A</sub>. Ainsi, l'expression des marqueurs d'activation CD69, CD25 et HLA-DR a été mesurée sur les sous-populations effectrices, soit les T CD4<sup>+</sup> et les T CD8<sup>+</sup>, après six jours de culture.

#### **3.3.2.1. Marqueurs d'activation sur les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>**

##### **3.3.2.1.1 Expression du marqueur d'activation CD69**

Nous n'avons pas pu analyser la modulation de l'expression du CD69, médiée par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées, au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> en présence des cellules cibles. Les résultats ne sont pas interprétables car il n'y a pas une augmentation de l'expression du CD69 au niveau des contrôles positifs, soit les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> du donneur A mises en culture avec les cellules cibles irradiées du donneur B ou C (figure 10).

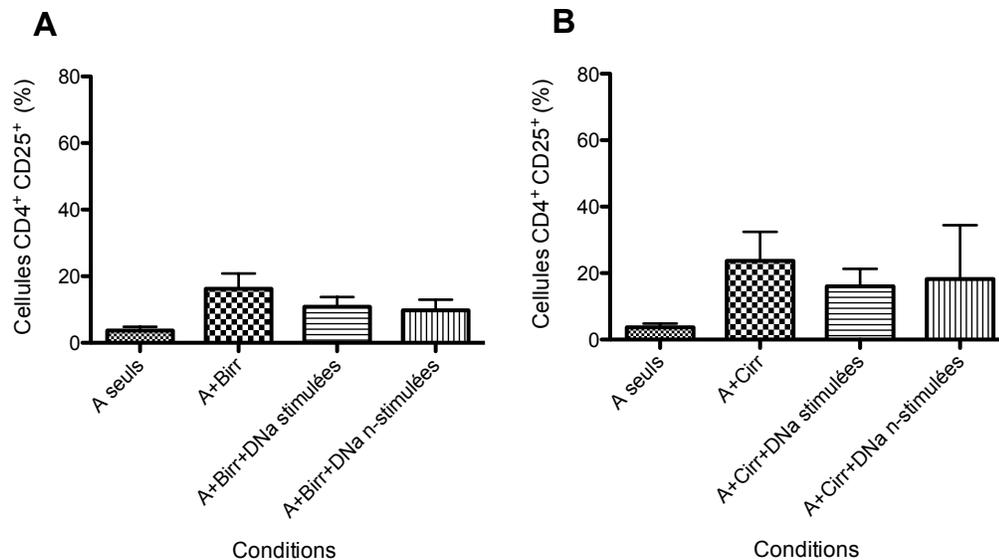


**Figure 10- Expression du marqueur d'activation CD69 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du CD69 sur les T CD4<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

### 3.3.2.1.2 Expression du marqueur d'activation CD25

Le marqueur d'activation CD25 n'est pas exprimé au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> du donneur A mises en culture seules. Lorsqu'il y a l'ajout des cellules cibles du donneur B ou C, l'expression du CD25 des cellules effectrices augmente. Cependant, l'expression du CD25 n'est pas modulée au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> en présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées et des cellules cibles irradiées provenant du donneur B et C, comparativement aux contrôles positifs en absence des cellules T DN<sub>A</sub> (figure 11).

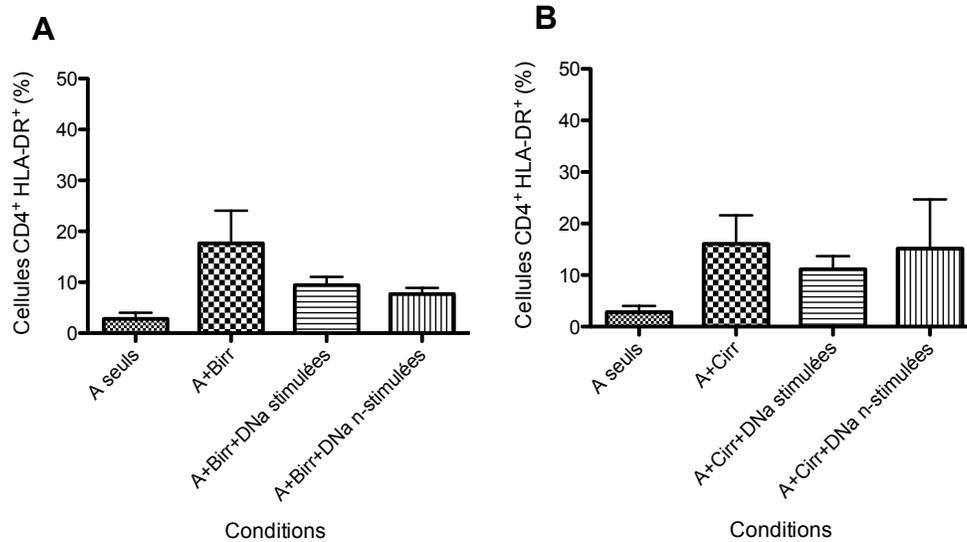


**Figure 11- Expression du marqueur d'activation CD25 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du CD25 sur les T CD4<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

### 3.3.2.1.3 Expression du marqueur d'activation HLA-DR

L'expression du marqueur d'activation HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> n'est pas modulée significativement par la présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées et des cellules cibles provenant du donneur B et C (figure 12A et 12B). Nous remarquons une tendance à la diminution de l'expression du HLA-DR lorsque les T DN<sub>A</sub> non-stimulées sont présentes avec les cellules cibles irradiées du donneur B (figure 12 A, p=0.057). Nous prévoyons de répéter nos expériences afin de vérifier si cette diminution de l'expression du HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> devient significative.



**Figure 12- Expression du marqueur d'activation HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>.**  $2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du HLA-DR sur les T CD4<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

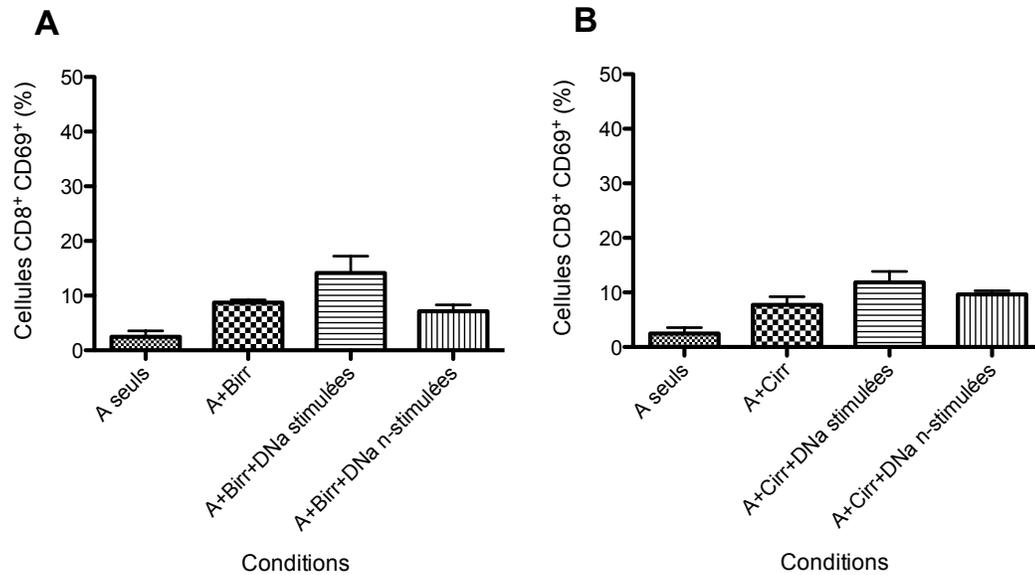
Il est important de remarquer que l'expression des marqueurs d'activation est élevée comparativement à l'expression des cellules du donneur A mises en culture seules (sauf dans le cas du CD69) (figures 11 et 12). Cela valide nos expériences et confirme qu'il n'y a pas eu de modulation de l'expression de HLA-DR et de CD25 par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées au moment où l'analyse des résultats a été effectuée. Néanmoins, cette augmentation des marqueurs d'activation n'a pas été spectaculaire et nous soulevons l'hypothèse qu'il y aurait pu avoir une modulation de l'expression des marqueurs d'activation si celle-ci avait été étudiée à un moment plus précoce durant la MLR. En effet, il est connu que le CD69 est exprimé à partir de quatre heures, que le CD25 est exprimé à partir de douze à vingt-quatre heures et que le HLA-DR est exprimé à partir de quarante-huit à soixante heures après l'activation des lymphocytes T<sup>150</sup>. Puisque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement sont immunosuppressives et inhibent la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>, nous formulons l'hypothèse qu'une étude plus précoce des marqueurs d'activation durant la MLR pourrait montrer une inhibition de ceux-ci par les cellules T DN<sub>A</sub>. Il est important de noter que l'effet des cellules T DN murines et humaines sur l'expression des marqueurs d'activation des cellules effectrices n'a jamais été étudié.

### 3.3.2.1. Marqueurs d'activation sur les cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>

Comme pour les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>, nous n'avons observé aucune modulation significative de l'expression des marqueurs d'activation, soit le CD69 (figure 13), le CD25 (figure 14) et le HLA-DR (figure 15), sur les cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> en présence des cellules cibles irradiées du donneur B et C par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées.

#### 3.3.2.1.1 Expression du marqueur d'activation CD69

En ce qui concerne le CD69, les résultats obtenus démontrent qu'il y a une augmentation non-significative de son expression sur les cellules T CD8<sup>+</sup> lorsqu'il y a présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement et des cellules cibles irradiées provenant du donneur B, comparativement au contrôle positif sans cellules T DN<sub>A</sub> (figure 13A, p=0.061). De plus, il n'y a pas de modulation significative de l'expression du CD69 lorsqu'il y a présence des cellules T DN<sub>A</sub> non-stimulées en présence des cellules cibles irradiées du donneur B (figure 13A). Ensuite, les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées induisent une augmentation non-significative du CD69 sur les cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> provenant du donneur A et des cellules cibles irradiées du donneur C (figure 13B, p=0.100), contrairement aux cellules T DN<sub>A</sub> non-stimulées, qui n'induisent aucune modulation de l'expression du CD69 (figure 13B). Nous devrions répéter nos expériences afin de renforcer nos conclusions. Nous pourrions observer si la tendance se maintient et si la modulation de l'expression du CD69 au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup> devient significative.

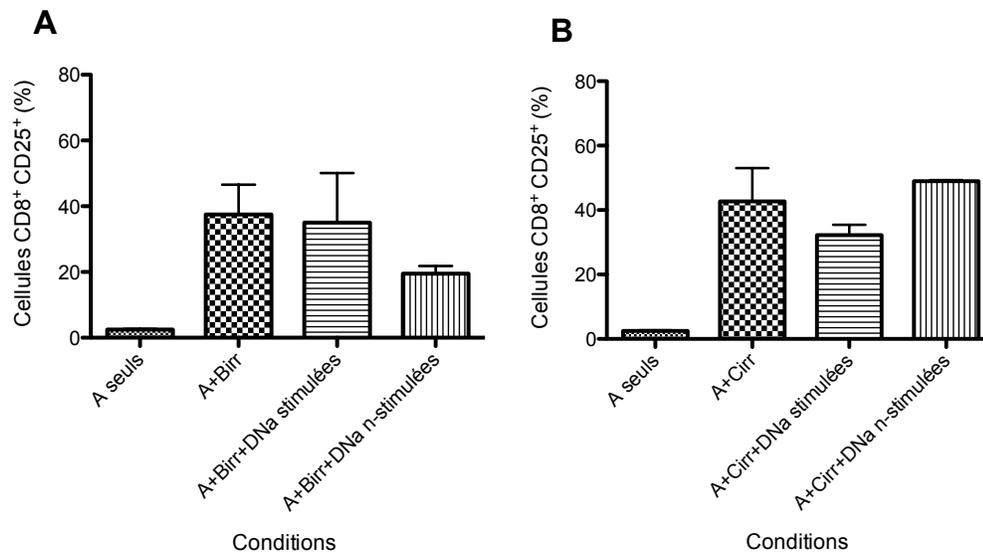


**Figure 13- Expression du marqueur d'activation CD69 au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du CD69 sur les T CD8<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

### 3.3.2.1.2 Expression du marqueur d'activation CD25

L'expression du CD25 n'est pas modulée significativement au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup> lors de la présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées dans les conditions étudiées (figure 14). Nous observons une diminution non-significative du CD25 sur les cellules T CD8<sup>+</sup> lorsqu'il y a présence des cellules T DN<sub>A</sub> non-stimulées et des cellules cibles irradiées provenant du donneur B, comparativement au contrôle positif (figure 14A, p=0.100). Il faudrait augmenter le nombre d'expériences afin de vérifier si la modulation de l'expression du CD25 au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées ne devient pas significative.

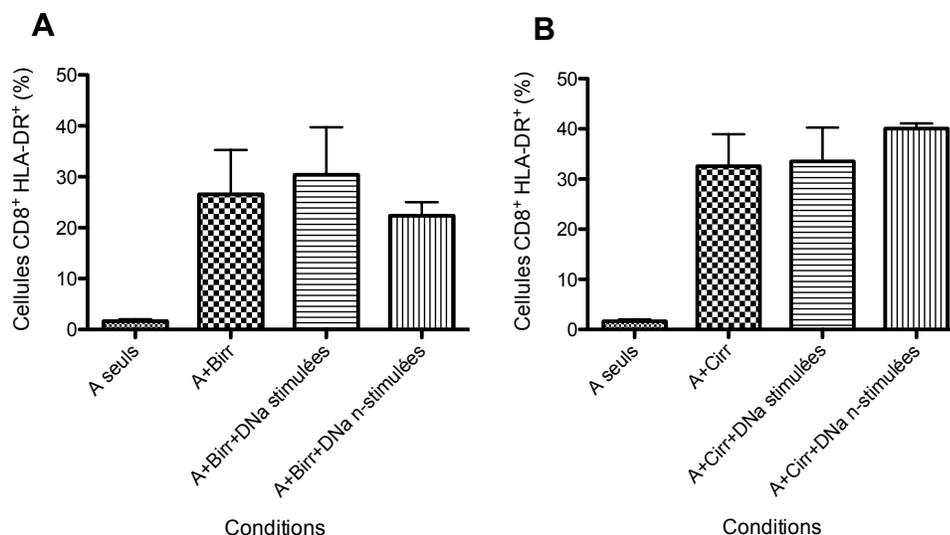


**Figure 14- Expression du marqueur d'activation CD25 au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A ( $DN_A$ ) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les  $PBMC_B$  irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du CD25 sur les T CD8<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.

### 3.3.2.1.3 Expression du marqueur d'activation HLA-DR

L'expression du HLA-DR n'est pas modulée sur les cellules T CD8<sup>+</sup> du donneur A en présence des cellules T  $DN_A$  stimulées ou non-stimulées et des cellules cibles irradiées du donneur B et C (figure 15).



**Figure 15- Expression du marqueur d'activation HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>.** 2x10<sup>5</sup> cellules du donneur A mises en culture en présence de 2x10<sup>5</sup> cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A, n=3) ou C (B, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après six jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression du HLA-DR sur les T CD8<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

Il est à noter que l'expression des marqueurs d'activation est élevée au niveau des contrôles positifs (en absence des cellules T DN<sub>A</sub>), comparativement aux cellules effectrices du donneur A mises en culture seules (figures 13, 14 et 15). Ceci valide nos expériences et confirme que nous n'observons pas de modulation de l'expression des marqueurs d'activation lors de la présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées six jours après la mise en culture.

Nous n'avons pas démontré l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> par les T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement par les cellules irradiées du donneur B (figure 9). Ainsi, il est logique que les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement ne diminuent pas l'expression des marqueurs d'activation au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> en présence des cellules cibles du donneur B ou C.

### 3.3.3 Apoptose

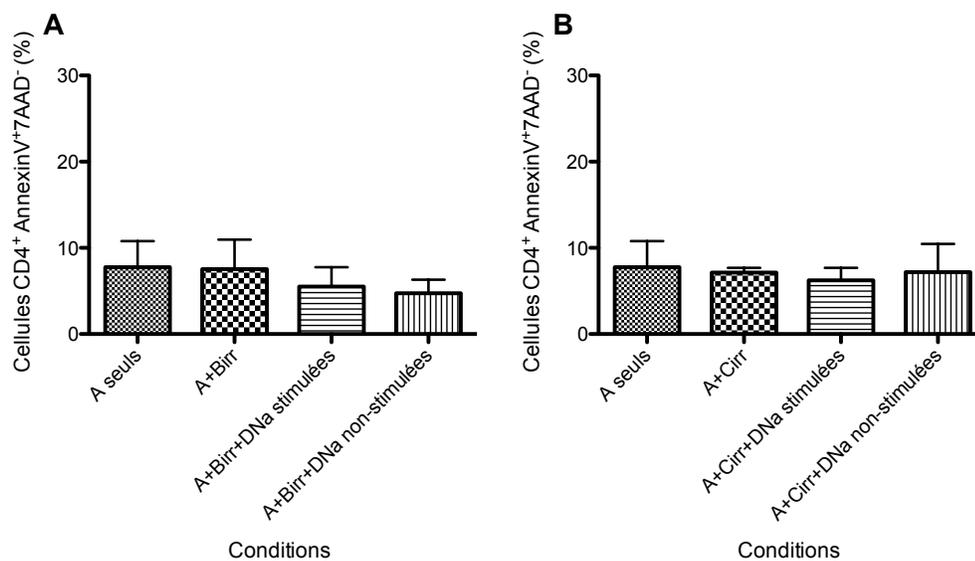
Étant donné que le mécanisme utilisé par les cellules T DN humaines pour inhiber la prolifération des sous-populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> n'est pas connu, nous avons tenté de vérifier si les cellules effectrices inhibées par les T DN<sub>A</sub> stimulées par les cellules irradiées du donneur B entraient en apoptose durant la MLR.

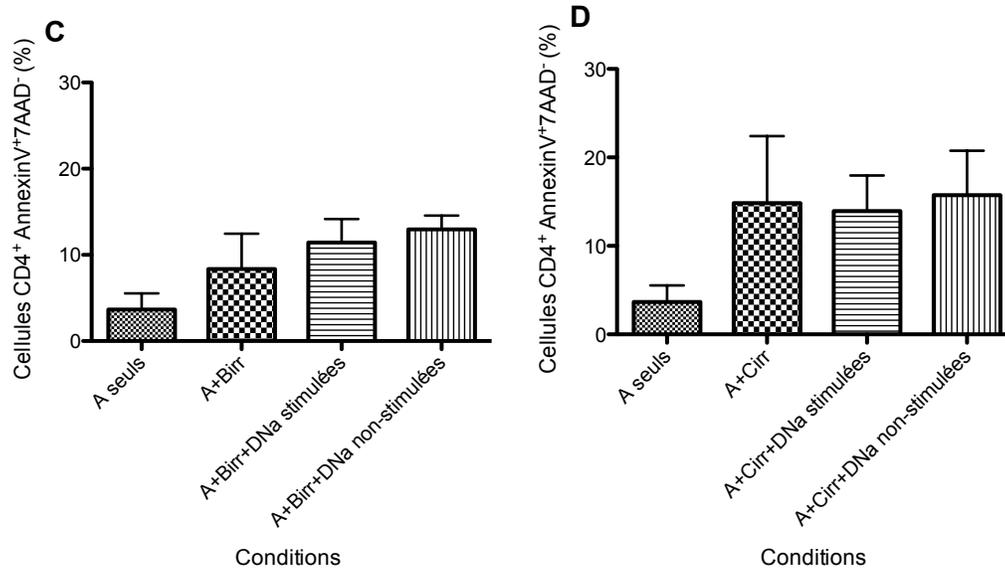
L'équipe de Fischer K. *et al.* a étudié l'induction de l'apoptose des cellules cibles T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN humaines stimulées<sup>111</sup>. Leur étude a montré que les cellules T DN stimulées induisaient l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> après quatre heures de co-incubation. Pour étudier l'apoptose, nous avons analysé l'expression de l'Annexin V et le 7AAD, trois jours après le début de la MLR (J3) ainsi qu'à la fin de la MLR, soit après six jours (J6). En effet, l'apoptose précoce est caractérisée par cytométrie en flux lorsque les cellules sont

AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>, donc exprimant la phosphatidylsérine (PS) à leur surface mais possédant toujours une membrane cellulaire intacte<sup>159,161,197</sup>. Par ailleurs, l'apoptose tardive se caractérise par des cellules AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>, donc des cellules ne possédant plus une membrane cellulaire intacte et exprimant toujours la PS à leur surface<sup>159,161</sup>. Les résultats obtenus pour l'apoptose tardive ne sont pas montrés, car la valeur la plus élevée pour les deux sous-populations effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> était de 0.3%, sans aucune différence significative entre les groupes. Nous avons donc analysé l'entrée en apoptose précoce de nos deux sous-populations effectrices, soit les T CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup>.

### 3.3.3.1. Apoptose des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>

Comme nous l'observons à la figure 16, les cellules T CD4<sup>+</sup> n'entrent pas en apoptose précoce lorsque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées par les cellules cibles irradiées du donneur B sont présentes. Nous pouvons constater que l'apoptose augmente généralement au J6 par rapport au J3 (figure 16), sauf lorsque les cellules du donneur A sont mises en culture seules car elles maintiennent un niveau d'apoptose faible après six jours (figure 16).





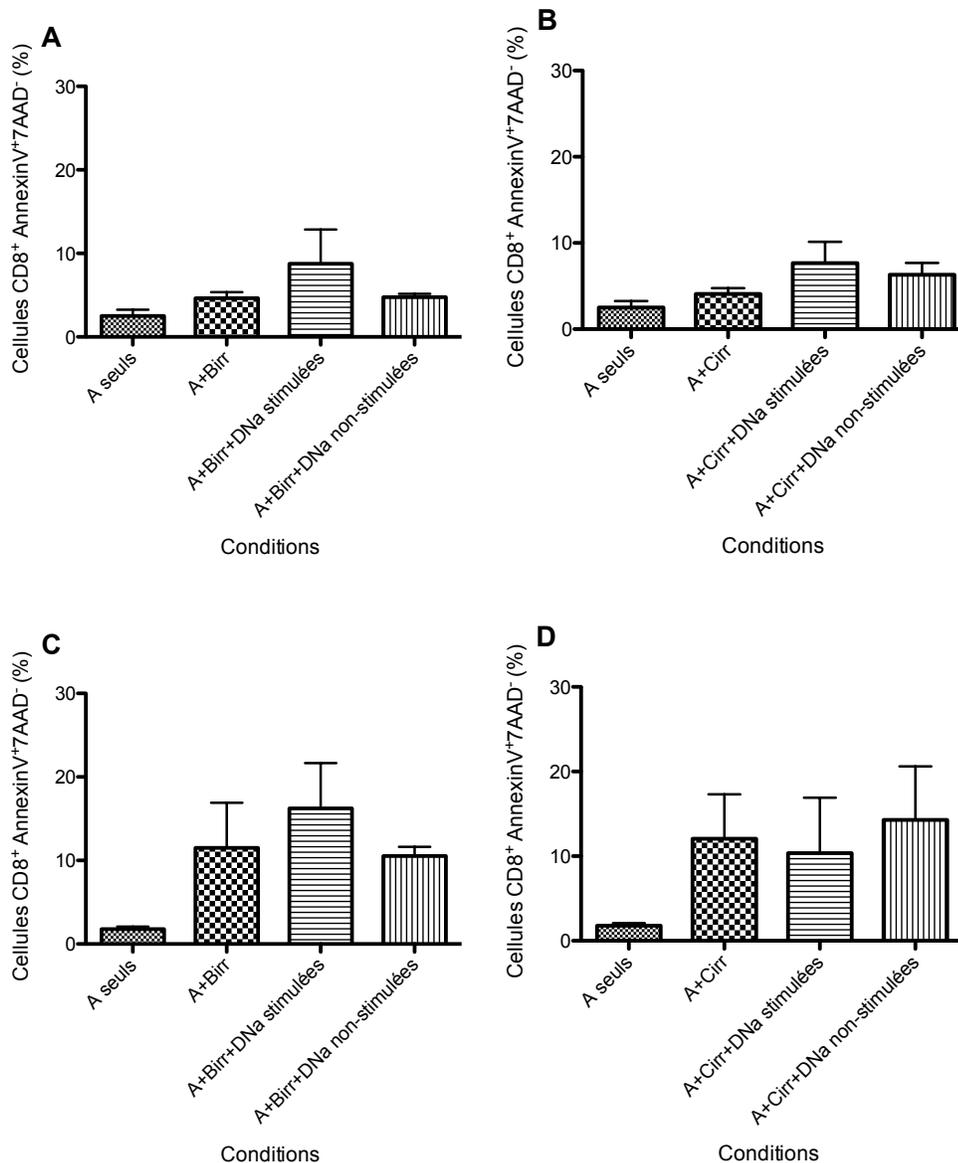
**Figure 16- Induction de l'apoptose précoce des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A et C, n=3) ou C (B et D, n=3). Les cellules T DN provenant du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après trois (A et B) et six jours (C et D) de culture, respectivement, les cellules sont récoltées et l'apoptose précoce des cellules T CD4<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux. *L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.*

Nous avons émis pour hypothèse que les cellules T DN humaines stimulées spécifiquement inhibent la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> en induisant l'apoptose de celles-ci. Nos résultats ne confirment pas notre hypothèse.

### 3.3.3.2. Apoptose des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>

Nous n'avons pas remarqué une modulation significative de l'apoptose précoce au niveau de la sous-population effectrice T CD8<sup>+</sup>, en présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées (figure 17). L'apoptose précoce est aussi augmentée au J6 par rapport au J3 au niveau de la sous-population T CD8<sup>+</sup> (figure 17), tout comme la sous-population T CD4<sup>+</sup> démontrée ci-dessus. Ceci est vrai sauf lorsque les cellules du donneur A sont mises en culture seules car elles conservent un niveau d'apoptose faible, même à la fin de la MLR (figure 17).



**Figure 17- Induction de l'apoptose précoce des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>.**

$2 \times 10^5$  cellules du donneur A mises en culture en présence de  $2 \times 10^5$  cellules cibles irradiées provenant du donneur B (A et C,  $n=3$ ) ou C (B et D,  $n=3$ ). Les cellules T DN provenant du donneur A ( $DN_A$ ) sont ajoutées après avoir été stimulées ou non par les  $PBMC_B$  irradiées. Après trois (A et B) et six jours (C et D) de culture respectivement, les cellules sont récoltées et l'apoptose précoce des cellules T CD8<sup>+</sup> est mesurée par cytométrie en flux ( $n=3$ ). L'analyse statistique par le test Mann-Whitney n'a donné aucune significativité.

Il a été démontré à plusieurs reprises que les cellules T DN murines utilisent le mécanisme GrzB/perforine et/ou Fas-FasL afin d'immunosupprimer leurs cibles<sup>110,112,192</sup>. Cependant, l'induction de l'apoptose par les T DN murines au niveau des cellules effectrices n'a jamais été mesurée dans la littérature.

Par ailleurs, il a été démontré que les cellules T DN humaines (donneur A) captent le complexe CMH-peptide des cellules DCs matures allogéniques (donneur B) lorsqu'il y a incubation de ces cellules à un ratio de 5 DN : 1 DC pendant douze heures<sup>111</sup>. Ensuite ces cellules T DN stimulées par les cellules DCs allogéniques induisent l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> (donneur B), précisément, à un ratio de 1 DN stimulée : 1 CD8<sup>+</sup> après quatre heures de co-incubation<sup>111</sup>.

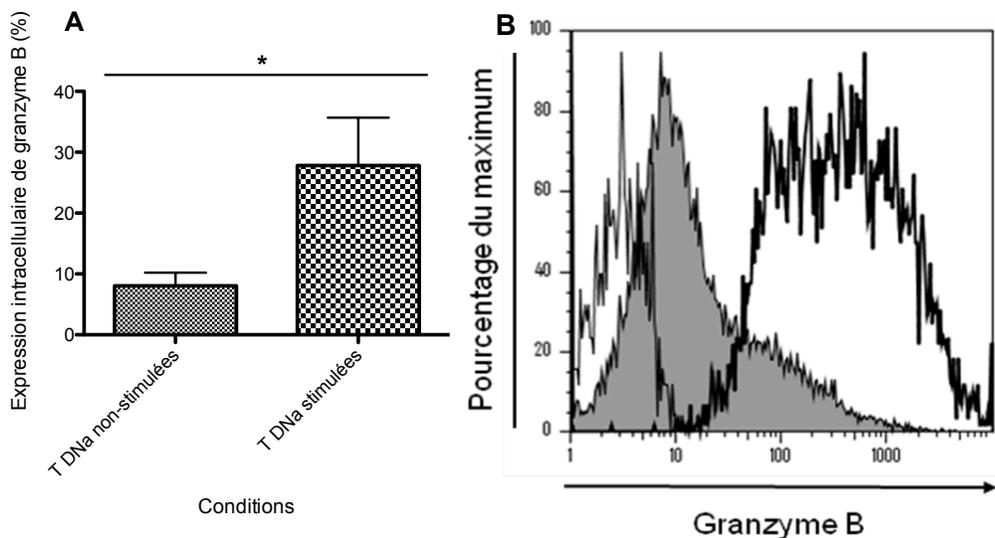
Nous avons donc émis comme hypothèse que les cellules T DN humaines stimulées spécifiquement par les cellules cibles irradiées du donneur B, induiraient l'apoptose des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup> du donneur A en présence des cellules irradiées du donneur B. Cependant, nous n'avons pas observé une augmentation significative de l'apoptose lorsque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées sont présentes dans les conditions étudiées. Les résultats obtenus ne concordent donc pas avec notre hypothèse. L'apoptose induite par les cellules T DN humaines stimulées par les DCs au niveau des cellules T CD8<sup>+</sup>, dans l'étude de Fischer K. *et al.*, n'était pas dans le cadre d'une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles<sup>111</sup>. De plus, le ratio de stimulation était de 5 DN : 1 DC et l'apoptose était induite lorsqu'il y avait 1 DN : 1 CD8<sup>+</sup> alors que notre ratio était 1 DN : 4 PBMCs. Nous ne pouvons donc pas conclure que nos résultats contredisent la littérature.

### 3.3.3.1. Granzyme B

Vu que la GrzB est exprimée chez les cellules T DN murines<sup>110,192</sup>, nous voulions mesurer l'expression de cette protéase au niveau intracellulaire des cellules T DN humaines stimulées par les cellules irradiées du donneur B en comparaison avec leur état de base, c'est à dire lorsqu'elles sont amplifiées *in vitro* en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.

Comme nous le constatons à la Figure 18A, il y a une augmentation significative de l'expression intracellulaire de la GrzB des cellules T DN<sub>A</sub> lorsqu'elles sont stimulées spécifiquement par les cellules irradiées du donneur B ( $p < 0,05$ ). Il faut mentionner que les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement par les puits enrobés avec anti-CD3 et anti-CD28 expriment un niveau de base de la GrzB (Figure 18). Nous observons le décalage de

l'expression de la GrzB des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement par les cellules irradiées du donneur B (Figure 18B).



**Légende :**

**B)** Trait Fin : T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement- Contrôle Fluorescent Minus One  
 Aire grisée : T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement  
 Trait Épais : T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement et avec les PBMC<sub>B</sub> irr

**Figure 18 : Expression de la protéine GrzB par les cellules T DN<sub>A</sub>.**

$2 \times 10^5$  cellules T DN du donneur A (DN<sub>A</sub>) sont mises en culture après avoir été stimulées ou non par les PBMC<sub>B</sub> irradiées. Après trois jours de culture, les cellules sont récoltées et l'expression intracellulaire de la GrzB des cellules T DN<sub>A</sub>, stimulées ou non-stimulées spécifiquement par les PBMC<sub>B</sub> irradiées, est mesurée par cytométrie en flux (A, n=3). Représentation des résultats obtenus par histogramme de superposition (B) de l'expression intracellulaire de GrzB au niveau des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement (A, aire grisée) et stimulées spécifiquement après trois jours de culture (A, trait épais). *Test Mann-Whitney*, \*:  $p < 0,05$

Ce résultat concorde avec notre hypothèse et la littérature<sup>110,112,192</sup> car les cellules T DN humaines stimulées spécifiquement augmentent leur niveau d'expression intracellulaire de la GrzB. Ceci suggère que les cellules T DN<sub>A</sub> utilisent la GrzB afin d'inhiber la prolifération des cellules effectrices dans le cadre de la MLR. Nous ne pouvons pas exclure que les cellules T DN utilisent aussi la voie Fas-FasL. Il nous reste à vérifier si les cellules T DN utilisent la voie Fas-FasL pour tuer leurs cibles.

De plus, ces résultats confirment que nous devrions vérifier l'apoptose à des temps plus précoces car les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement semblent utiliser la GrzB pour

immunosupprimer les cellules effectrices. Par conséquent, cela suggère que les cellules inhibées meurent par apoptose.

## **Chapitre 4 : Discussion**

### **4.1 Purification et amplification des cellules T DN**

Le premier objectif de ce projet était d'isoler et de faire proliférer les cellules T DN à partir de sang périphérique humain afin de pouvoir étudier leur rôle ainsi que leur pouvoir immunomodulateur. Les cellules T DN murines, en tant que cellules immunosuppressives spécifiques aux antigènes, sont caractérisées depuis une dizaine d'années et leur rôle a été élucidé<sup>112,129,130,140,141,192</sup>. De plus, les cellules T DN humaines ont été purifiées et étudiées pour la première fois en tant qu'agents immunosuppresseurs par l'équipe de Fischer K. *et al.* en 2005<sup>111</sup>.

Nous avons réussi, de façon reproductible, à isoler des cellules T DN humaines à partir de sang périphérique humain provenant de donneurs sains. Nous avons obtenu des taux de pureté supérieurs à 99% (figure 6 A), nous permettant de les mettre en culture et de les amplifier par un facteur de  $10^3$  après deux semaines (Figure 6 B). De plus, ces cellules conservent habituellement ce taux de pureté après une semaine de mise en culture (Figure 6C). Sinon, nous les repurifions au besoin afin d'être certain que les effets observés soient spécifiquement dûs aux cellules T DN.

Les cellules T DN murines sont isolées et amplifiées à partir de splénocytes. Nous sommes les premiers à avoir fait proliférer des cellules T DN humaines purifiées à partir de sang périphérique *in vitro*. Notre facteur d'amplification nous permet d'étudier le rôle immunomodulateur des cellules T DN *in vitro* à des temps différents.

### **4.2 Phénotypage des cellules T DN**

Le phénotypage des cellules T DN a été effectué afin de bien caractériser les cellules et afin de les comparer à celles décrites chez la souris ainsi que chez l'humain<sup>111,112,149</sup>. Les cellules T DN humaines que nous isolons sont  $CD3^+CD5^+CD25^+CD45RO^+$  (figure 5 A, B, C et G) et  $CD45RA^-CD69^-CD127^-$  (figure 7G, 7D, 7F). De plus, une fraction d'entre elles exprime le CD31 (figure 7E). Alors que le phénotype décrit chez la souris n'est pas très consistant, quelques marqueurs sont exprimés en commun tels le CD3, le CD5 et le

CD25<sup>141,149</sup>. Les cellules T DN sont des lymphocytes T, donc elles expriment le CD3 et le CD5 (figure 7A et 7B)<sup>191</sup>.

Lorsque nous mettons les cellules T DN en culture, elles se trouvent en présence des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, qui activent de façon non-spécifique leur TCR et leur donne un signal de costimulation, respectivement<sup>198</sup>. Les cellules T DN sont donc activées et peuvent proliférer. Nous mettons aussi l'IL-2 et IL-4 en culture avec ces cellules afin d'augmenter leur capacité de prolifération. Ceci explique pourquoi les cellules expriment le CD25, soit le récepteur de l'IL-2 (figure 7C). Étant donné que ce sont des cellules effectrices, il est donc normal qu'elles n'expriment pas le récepteur de l'IL-7, soit le CD127 (figure 7F)<sup>195</sup>. Les cellules T DN murines transgéniques étudiées par deux équipes différentes expriment ou non le CD25<sup>141,149</sup>. Par contre, chez l'humain, le phénotype des cellules T DN fraîchement isolées n'exprime ni le CD25, ni le CD69<sup>111</sup>. Le CD69 est un marqueur d'activation précoce<sup>150</sup>. Étant donné que nous avons effectué le phénotypage une semaine après la mise en culture et l'activation des cellules T DN, cela explique sans doute pourquoi nous n'observons pas la présence du marqueur d'activation précoce CD69 (figure 7D) tout comme les cellules provenant du sang périphérique. Si nous faisons le phénotypage plus tôt, soit un jour après la mise en culture, il y aurait probablement une expression du CD69 car les cellules T DN sont fortement activées dans leurs puits enrobés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 ainsi que l'IL-2 et l'IL-4.

Le CD45RO est fortement exprimé au niveau des cellules effectrices et mémoires et faiblement au niveau des cellules naïves<sup>193</sup>. Le CD45RA est exprimé au niveau des cellules naïves et mémoires alors qu'il n'est pas exprimé sur les cellules effectrices<sup>196</sup>. Cela signifie que nos cellules T DN sont au stade effecteur après avoir été activées et mises en culture pendant une semaine (figure 7G). Dans la littérature, lors du phénotypage des cellules T DN provenant du sang périphérique, deux populations ont été remarquées, soit les CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> et les CD45RA<sup>low</sup>CCR7<sup>-</sup>, indiquant qu'il existe des populations T DN naïve et effectrice<sup>111</sup>. Cependant, nos cellules ont toutes été mises en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28, expliquant leur différenciation au stade effecteur et donc leur expression homogène du CD45RO<sup>+</sup> (figure 7H).

Pour terminer, le CD31 est utilisé pour distinguer les T CD4<sup>+</sup> naïves des T CD4<sup>+</sup> centrales exprimant un niveau de TRECs différent dans le sang périphérique humain<sup>194</sup>. De ce fait, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, des émigrants thymiques récents, expriment le CD31<sup>194</sup>. Cependant, les cellules T DN que nous avons étudiées n'expriment pas le CD45RA (figure 7G). Ainsi, les cellules T DN ne peuvent être considérées comme des émigrants thymiques récents, même si une partie de ces cellules expriment le CD31 (figure 7E).

Afin d'effectuer le phénotypage des cellules T DN, un nombre élevé de cellules est requis. Ceci explique pourquoi nous avons effectué ce phénotypage une semaine après la mise en culture et non plus tôt. L'idéal serait d'effectuer le phénotypage à des temps différents, soit un jour, trois jours et six jours après la mise en culture des T DN afin d'étudier leur différenciation du moment où elles sont mises en culture au moment où nous les récoltons pour effectuer des expériences.

### **4.3 Réaction lymphocytaire mixte (MLR)**

La méthode principale utilisée dans le cadre de ce projet est la MLR. Cette technique permet la vérification de l'histocompatibilité des PBMCs de donneurs différents<sup>21,26</sup>. Généralement, il y a vérification de la prolifération des cellules par CFSE quelques jours après mise en culture afin de déterminer si le donneur et le receveur possèdent une compatibilité HLA. Il est important de noter que le typage HLA I, II et III ne se fait pas avant la mise en culture d'un donneur et d'un receveur dans le cadre d'une MLR. Les chances que le donneur et le receveur, qui sont des donneurs sains non-apparentés, soient compatibles étant quasiment nulles.

Dans notre cas, nous effectuons des MLRs unidirectionnelles, c'est-à-dire que les PBMCs du receveur, considérées comme la cible, sont inactivées par irradiation. Nous voulons uniquement étudier l'action des cellules T DN sur les cellules effectrices, soit par la prolifération de ces dernières, leurs marqueurs d'activation ainsi que leur entrée en apoptose<sup>22,23,26</sup>. Nous avons mis au point cette technique en mettant un ratio de 1 DN pour 4 PBMCs ( $5 \times 10^4$  :  $2 \times 10^5$  cellules).

L'équipe de Li Zhang a effectué pour la première fois une MLR avec des cellules T CD8<sup>+</sup> et des cellules T DN purifiées à partir de splénocytes<sup>112</sup>. Les ratios DN : T CD8<sup>+</sup> suivants ont été étudiés, soit 10 :1, 5 :1, 2.5 :1 et 1.25 :1<sup>112</sup>. Les cellules T DN murines stimulées ont inhibé la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> syngéniques murines de façon dose-dépendante<sup>112</sup>.

Ensuite, il a été démontré que les cellules T DN humaines stimulées par des cellules DCs allogéniques (donneur B) à un ratio de 5 DN : 1 DC, peuvent induire l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> (donneur B) à un ratio de 1 DN : 1 CD8<sup>+</sup><sup>111</sup>. Ce modèle vérifie uniquement la capacité des cellules T DN de tuer leurs cibles allogéniques. Contrairement à cette équipe, nous vérifions la capacité des cellules T DN de protéger les cellules cibles des cellules effectrices, en immunosupprimant ces dernières. Dans le cas où un patient reçoit une greffe, il serait intéressant que les cellules T DN du greffon puissent immunosupprimer les cellules T effectrices syngéniques afin que ces dernières ne réagissent pas contre les cellules de l'hôte.

Nous n'avons pas essayé des ratios différents car nous avons beaucoup de conditions. Dans nos expériences futures, il sera important d'essayer plusieurs ratios afin de vérifier le pouvoir immunosuppresseur des cellules T DN envers les cellules effectrices syngéniques. Cela nous permettrait de connaître si ces cellules inhibent les cellules effectrices de façon dose dépendante.

#### **4.3.1. Prolifération**

Dans un premier temps, nous avons évalué la prolifération des PBMCs effecteurs, soit les sous-populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>. Pour se faire, nous avons utilisé le CFSE, afin d'évaluer une réduction de la fluorescence à la fin de la MLR (J6). Nous constatons que les cellules effectrices (PBMC<sub>A</sub>) ne prolifèrent pas lorsqu'elles sont mises en culture seules. Cependant, lorsque nous rajoutons les cellules cibles irradiées du donneur B ou C, la prolifération des deux sous-populations effectrices, T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> se trouve à un niveau plus élevé que celle des PBMC<sub>A</sub> seules (figure 8A et 8B et figure 9A et 9B).

Étant donné que les cellules T DN sont censées avoir des propriétés spécifiques aux antigènes auxquels elles ont préalablement été exposées, nous avons stimulé ces cellules avec les cellules irradiées du donneur B. Ceci nous a permis de vérifier si le fait d'avoir déjà rencontré les antigènes présentés à la surface des APCs de la cible ne permettrait pas aux T DN<sub>A</sub> d'inhiber davantage la prolifération des cellules effectrices syngéniques. Cette stimulation se fait pendant 3 jours à un ratio de 1 DN : 1 PBMC, soit  $2 \times 10^5$  cellules par puits. Il est à noter que nous n'avons pas stimulé les cellules T DN avec des ratios DN : PBMCs différents.

Dans nos expériences futures, nous reproduirons les ratios utilisés pour les stimulations avec les cellules T DN murines *in vitro*, soit d'un ratio 1 DN : 10 PBMCs<sup>129</sup>. Il serait aussi intéressant de purifier les cellules dendritiques à partir des PBMCs afin d'optimiser l'effet stimulateur au niveau des T DN et d'essayer la stimulation avec un ratio de 5 DN : 1 DC, comme il a été effectué par l'équipe de Fischer K. *et al.*<sup>111</sup>. Après amplification et maturation *in vitro* des DCs, il serait même possible d'obtenir un ratio proche de 1 DN : 1 DC. Ceci permettra aux cellules T DN de capter un plus grand nombre de complexes CMH I-peptide allogéniques et d'augmenter leur pouvoir immunosuppresseur.

Lorsque nous mettons les T DN<sub>A</sub> stimulées en présence des cellules effectrices du donneur A et des cellules cibles irradiées du donneur B, nous avons remarqué qu'il y a une inhibition significative de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> (figure 8A) mais l'inhibition est non-significative au niveau des T CD8<sup>+</sup> (figure 9A). Il faudrait reproduire cette expérience afin de vérifier si nous obtenons une inhibition significative. Cependant, lorsque les T DN<sub>A</sub> non-stimulées sont en présence des cellules effectrices du donneur A et des cellules cibles irradiées du donneur B, nous observons une inhibition de la prolifération des sous-populations effectrices mais de façon moins prononcée (figure 8A et figure 9A). Nous pouvons donc conclure que les cellules T DN<sub>A</sub> sont en mesure d'inhiber la prolifération des cellules effectrices de manière significative uniquement lorsqu'elles sont préalablement stimulées par la cible, soit les cellules irradiées du donneur B.

La théorie de Li Zhang stipule que les cellules T DN<sub>A</sub> capturent le complexe CMH I-peptide présenté par les APCs de la cible pour le présenter à leur surface par un mécanisme

inconnu<sup>112</sup>. Ensuite, elles peuvent inhiber de façon spécifique les cellules effectrices syngéniques, donc du même donneur<sup>112</sup>.

De plus, il a été démontré chez l'humain que les cellules T DN « volent » les complexes HLA-A2-peptide des APCs du receveur pour les présenter à leur surface<sup>111</sup>. Les cellules T DN humaines stimulées avec les cellules DCs allogéniques (donneur B) à un ratio de 5 DN : 1 DC pendant douze heures, ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> allogéniques (donneur B) à un ratio 1 DN : 1 CD8<sup>+</sup>, vingt-quatre heures après le début de la co-incubation<sup>111</sup>.

Nous avons voulu vérifier la capacité des cellules T DN humaines de protéger les cellules cibles en inhibant la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, uniquement lorsqu'elles ont préalablement été stimulées par les antigènes exprimés à la surface de ces cellules cibles. Nos résultats suggèrent que les cellules T DN humaines partagent les mêmes caractéristiques que chez la souris uniquement en ce qui concerne l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup>, dans le cadre d'une MLR avec des cellules cibles et effectrices<sup>112</sup>.

Pour renforcer nos conclusions, nous avons aussi mis les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées par les cellules irradiées du donneur B, en présence des cellules effectrices du donneur A et des cellules cibles irradiées du donneur C afin d'étudier leur pouvoir immunosuppresseur non-spécifique, n'ayant jamais été en contact avec les cellules du troisième donneur C. Nous avons observé que les T DN<sub>A</sub> stimulées ou non-stimulées n'ont pas inhibé les cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> (figure 8B) ou T CD8<sup>+</sup> (figure 9B). Ceci confirme notre hypothèse que les cellules T DN<sub>A</sub> sont des cellules possédant des propriétés immunosuppressives spécifiques aux antigènes auxquels elles ont préalablement été exposées.

Nous sommes la première équipe qui démontre le pouvoir immunosuppresseur spécifique aux antigènes des cellules T DN humaines dans le cadre d'une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles. Ceci met en évidence que les propriétés observées chez la souris sont aussi présentes au niveau des cellules humaines. Nous avons mis au point une MLR non seulement pour étudier le rôle immunomodulateur des cellules T DN au niveau

de la prolifération mais aussi pour aussi étudier leur effet modulateur sur les marqueurs d'activation au niveau des cellules effectrices inhibées.

Il serait intéressant d'effectuer une MLR avec des ratios DN : PBMCs différents. De plus, il serait aussi intéressant de purifier les cellules T CD4<sup>+</sup> et les cellules T CD8<sup>+</sup> des PBMCs effectrices afin de pouvoir obtenir des ratios plus précis, comme 1 DN : 1 CD8<sup>+</sup> ou 1 DN : 1 CD4<sup>+</sup>, en présence des cellules cibles. Ceci nous permettrait d'observer la puissance de l'immunosuppression des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées.

### 4.3.2. Marqueurs d'activation

Nous avons aussi vérifié les marqueurs d'activation CD69, CD25 et HLA-DR au niveau des deux sous-populations de cellules effectrices, soit les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>.

Le premier marqueur d'activation vérifié est le CD69, qui est un marqueur d'activation précoce exprimé à la surface des cellules T<sup>150</sup>. Le CD69 aurait pu être exprimé de façon plus prononcée au niveau des cellules T effectrices quelques heures suivant le début de la MLR. Cependant, lorsque nous analysons nos échantillons, nous n'observons pas de modulation de l'expression de ce marqueur au niveau des cellules effectrices T CD8<sup>+</sup>. Étant donné que nous mettons fin à la MLR après 6 jours, il est logique que le niveau d'expression du CD69 ne soit élevé pour aucune condition, car il a dû revenir à son expression physiologique (Figure 10 et 13).

Étant donné que nous n'avons pas observé une augmentation de l'expression du CD69 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> en présence des cellules cibles du donneur B ou C, nous n'avons pas pu étudié si les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées inhibent l'expression de ce marqueur au niveau de ces cellules. Le CD69 est exprimé au niveau des lymphocytes T à partir de quatre heures après leur activation, alors il se pourrait qu'il y ait eu une augmentation de l'expression du CD69 au niveau des contrôles positifs plus tôt durant la MLR.

Nous avons uniquement mesuré l'expression du CD69 à la fin de la MLR. Il est certain que le CD69 ne devrait pas être vérifié à la fin de la MLR, soit après six jours. Dans nos

expériences futures, ce marqueur devrait être vérifié jusqu'à vingt-quatre heures après le début de la MLR<sup>156,199</sup> afin d'étudier la modulation de son expression, vu qu'il est exprimé au niveau des cellules T quatre heures après leur activation<sup>150</sup>. Nous avons émis comme hypothèse que les cellules T DN stimulées diminueraient l'expression du CD69 car les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées sont censées immunosupprimer les cellules T effectrices. Cependant, la modulation de l'expression du marqueur d'activation CD69 au niveau des cellules T effectrices par les cellules T DN murines n'a jamais été étudiée durant une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles.

Le second marqueur d'activation étudié est le CD25. Étant donné qu'il n'y a pas de cytokines dans le milieu, les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> ne devraient pas exprimer ce marqueur si elles ne sont pas activées par la MLR. Le CD25 est généralement exprimé à la surface des lymphocytes de douze à vingt-quatre heures après la stimulation antigénique<sup>157</sup>. De ce fait, nous n'avons pas observé une modulation significative de l'expression du CD25 au niveau des deux sous-populations effectrices dans les conditions vérifiées (figures 11 et 14). Nous n'avons pas mesuré l'expression du CD25 au niveau des cellules effectrices avant la fin de la MLR. Il se peut qu'il y ait eu une modulation significative de l'expression du CD25 plus tôt durant la culture et qu'elle ait été réduite après six jours. Dans nos expériences futures, il faudrait vérifier l'expression du CD25 plus tôt avant la fin de la MLR, soit jusqu'à trois jours.

Nous avons émis comme hypothèse que les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées diminueraient l'expression du CD25 au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>. Les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées ont un rôle immunosuppresseur envers les cellules T effectrices T CD4<sup>+</sup> alors nous nous attendions que le niveau d'expression de CD25 soit réduit sur ces cellules. La modulation de l'expression du marqueur d'activation CD25 par les cellules T DN murines n'a jamais été mesurée dans le cadre d'une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles. Les résultats ne contredisent pas la littérature.

Le dernier marqueur vérifié est HLA-DR, dont l'expression augmente chez les lymphocytes T lorsqu'ils sont activés à un moment tardif, soit de quarante-huit heures à soixante heures après l'activation<sup>150,153</sup>. Nous ne remarquons pas une modulation significative de l'expression du HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> en présence

des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées et des cellules cibles du donneur B et C (figures 12 et 15). Nous nous attendions à une réduction de l'expression du HLA-DR au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> lorsque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées étaient présentes avec les cellules cibles du donneur B par rapport aux contrôles positifs, car les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées immunosuppriment ces cellules T effectrices (figures 12 et 15). Cependant, il n'a jamais été étudié si les T DN murines modulent l'expression du HLA-DR au niveau des cellules effectrices durant une MLR avec des cellules effectrices et des cellules cibles.

Nos résultats contredisent notre hypothèse mais non la littérature étant donné qu'il n'y a pas d'évidence démontrant que les cellules T DN murines ont un pouvoir immunomodulateur sur l'expression du HLA-DR au niveau des cellules effectrices.

Vu que nous n'avons pas remarqué une cohérence entre l'inhibition de la prolifération des cellules effectrices par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et les marqueurs d'activation, il serait intéressant de vérifier l'expression de ces marqueurs d'activation à des temps différents après le début de la MLR. Il est certain que nous devrions augmenter notre nombre d'expériences afin de pouvoir confirmer nos observations. De plus, il existe d'autres marqueurs d'activation comme le CD38 et le CD71 pour les lymphocytes T<sup>151,154,155</sup>. Il serait donc pertinent de vérifier leur expression à des moments différents après le début de la MLR.

En somme, les cellules T DN humaines ont la capacité de diminuer l'alloréactivité spécifiquement vis-à-vis un antigène donné sans diminuer l'activation des cellules données. Ceci est très important dans le contexte clinique car les cellules T DN pourraient diminuer la GvH tout en gardant l'effet anti-tumoral. Nous voulions comprendre comment ces cellules inhibent les cellules effectrices alors nous avons mesuré l'induction de l'apoptose par les cellules T DN.

### 4.3.3 Apoptose

Vu que le mécanisme utilisé par les cellules T DN<sub>A</sub> pour inhiber la prolifération des cellules effectrices est inconnu, nous avons tenté de vérifier l'induction de l'apoptose en

présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées. L'Annexin V<sup>+</sup> est une protéine Ca<sup>2+</sup>-dépendante qui lie les phospholipides avec une haute affinité pour la PS<sup>159</sup>. Nous avons vérifié l'apoptose précoce, soit les cellules AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>, ainsi que l'apoptose tardive, AnnexinV<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup> (non montré), trois jours après le début de la MLR et à la fin de la MLR (J6). Nous n'avons pas remarqué une augmentation de l'apoptose précoce au J3 et au J6 lorsque les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées sont présentes dans toutes les conditions au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> (figures 16 et 17).

Afin de véritablement conclure que les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées par les cellules irradiées du donneur B n'induisent pas l'apoptose au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, nous devrions effectuer un marquage à l'AnnexinV et au 7AAD un jour après le début de la MLR. Il se pourrait que les cellules en apoptose ne soient pas détectées après trois jours. De ce fait, nous n'avons donc pas observé une induction de l'apoptose au niveau des cellules effectrices T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement.

Il a été démontré par Li Zhang que les cellules T DN murines tuent leurs cibles par le mécanisme Fas-FasL et/ou perforine-GrzB<sup>110,112,192</sup>. De plus, l'équipe de Sylvie Lesage démontre que les cellules T DN murines expriment un niveau significativement plus élevé de la GrzB lorsqu'elles reçoivent une stimulation allogénique<sup>110</sup>. Il a aussi été démontré que les cellules T DN humaines (donneur A) stimulées par des cellules DCs (donneur B) induisent l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> du donneur B après quatre heures de co-incubation<sup>111</sup>. Cependant, l'induction de l'apoptose par les cellules T DN stimulées, avec des cellules cibles irradiées, au niveau des cellules effectrices en présence des cellules cibles irradiées n'a jamais été étudiée. Nos résultats contredisent notre hypothèse car nous nous attendions à une augmentation de l'apoptose des cellules effectrices en présence des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées. Nous ne pouvons pas conclure que nos résultats contredisent la littérature car l'induction de l'apoptose par les cellules T DN murines n'a jamais été mesurée. De plus, cette induction effectuée par les cellules T DN humaines est uniquement mesurée lorsque les T DN sont stimulées par des DCs allogéniques (donneur B) et sont mises en présence de leur cibles, soit les T CD8<sup>+</sup> allogéniques (donneur B).

## Granzyme B

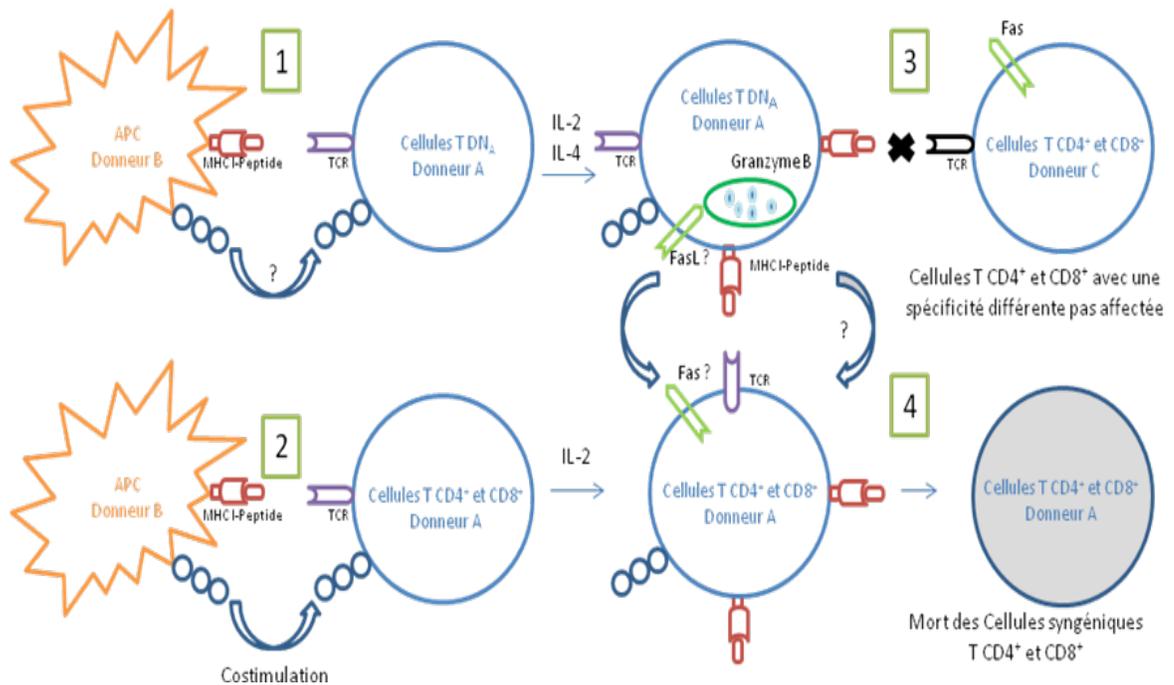
Les cellules T cytotoxiques utilisent principalement la voie GrzB pour tuer leurs cibles<sup>173</sup>. Récemment, il a été démontré que la GrzB est impliquée dans le mécanisme immunosuppresseur des cellules T régulatrices<sup>200,201</sup>. Des travaux récents ont aussi démontré que les cellules Tregs et les cellules immunitaires effectrices peuvent tuer leur cible par une voie perforine/granzyme ou par une voie granzyme seule, suggérant que chacune des protéines a un rôle dans l'immunosuppression médiée par les Tregs<sup>200-202</sup>.

Cependant les cellules T DN humaines provenant directement du sang périphérique n'expriment pas la GrzB<sup>111</sup>, alors que les cellules T DN murines l'expriment<sup>110,192</sup>. Nous avons donc vérifié l'expression de la GrzB des cellules T DN activées non-spécifiquement par les puits enrobés avec les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 après mise en culture. Lorsque les cellules sont stimulées non-spécifiquement, elles expriment la GrzB (figure 18). Cependant, lorsque nous avons vérifié l'expression de cette protéase au niveau des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement avec les cellules irradiées du donneur B, soit la cible durant la MLR, elles expriment un niveau significativement plus élevé que les cellules T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement (figure 18A), soit un décalage vers la droite (figure 18B).

Il a été démontré que les cellules T DN murines expriment un niveau significativement plus élevé de la GrzB lorsqu'elles reçoivent une stimulation allogénique que lorsqu'elles sont stimulées non-spécifiquement<sup>110</sup>.

De façon globale, il serait aussi intéressant d'effectuer plusieurs MLR différentes avec des ratios DN: PBMC différents. Nous n'avons étudié que le ratio 1 DN: 4 PBMCs (Donneur A) : 4 PBMC (Donneur B ou C). Il faudrait vérifier l'effet des T DN dans les ratios 1 DN : 1 PBMC (Donneur A) : 1 PBMC (Donneur B ou C) et des ratios avec un nombre décroissant de T DN par rapport aux PBMCs. Par ailleurs, il serait aussi intéressant de stimuler les cellules T DN avec des cellules dendritiques du donneur B afin que les T DN reçoivent une stimulation plus forte car lorsque nous mettons 1 DN : 1 PBMC, il n'y a pas une DN pour une APC. Il faudrait aussi purifier les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> des PBMCs effecteurs afin que les ratios soient plus précis.

Il est important de noter que nous n'avons effectué que trois expériences. Il faudrait varier nos temps d'analyses des échantillons ainsi qu'augmenter notre nombre d'expériences afin de pouvoir confirmer les effets immunomodulateurs des cellules T DN au niveau des cellules effectrices.



**Figure 19 : Hypothèse du mécanisme de transfert du complexe CMH classe I-peptide et de suppression des cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> par les cellules T DN<sub>A</sub> humaines.** Représentation schématique du transfert du complexe CMH classe I-peptide de la surface des APCs du donneur B par les cellules T DN<sub>A</sub> pour les présenter à leur surface (1). Lorsque les cellules T CD4<sup>+</sup> et les T CD8<sup>+</sup> acquièrent une spécificité pour le même complexe CMH de classe I-peptide des APCs du donneur B (2), les cellules T DN<sub>A</sub> préalablement stimulées par les PBMC<sub>B</sub>irr. leur envoient un signal de mort, par la voie GrzB/Perforine ou Fas/FasL (4). Cependant, les cellules T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> avec une spécificité du TCR différente ne reçoivent pas de signal de mort par les cellules T DN<sub>A</sub> (3). Adapté de Zhang Z-X. *et al.* Nature Medicine (2000)<sup>112</sup>.

À la figure 19, nous avons complété le modèle de Li Zhang<sup>112</sup>. En premier lieu, nous avons ajouté que les cellules T DN<sub>A</sub> humaines peuvent jouer à la fois au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> et des cellules T CD8<sup>+</sup> contrairement au modèle proposé initialement qui ne tient compte que des cellules T CD8<sup>+</sup> murines (voir figure 2). Nous avons étudié l'effet immunosuppresseur des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées et non-stimulées spécifiquement au niveau des cellules T CD4<sup>+</sup> et des cellules T CD8<sup>+</sup> du donneur A. Les cellules T DN<sub>A</sub>

stimulées spécifiquement ont inhibé de façon significative la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et non-significative celle des cellules T CD8<sup>+</sup>. De plus, nous avons démontré qu'il y a une augmentation significative de la GrzB au niveau des cellules T DN<sub>A</sub> stimulées spécifiquement comparativement aux cellules T DN<sub>A</sub> stimulées non-spécifiquement. Nous avons donc illustré à la figure 19, l'expression de la GrzB au niveau des cellules T DN<sub>A</sub>.

Dans un avenir prochain, nous effectuerons des MLR avec des ratios de stimulation différents et des ratios DN : PBMCs (ou T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> effectrices) différents. Nous ferons aussi la mesure des marqueurs d'activation et de l'apoptose à des temps différents après le début de la MLR. Nous aimerions aussi étudier le profil d'expression des cytokines durant la MLR. Jusqu'à présent, nous avons récolté le surnageant des puits à la fin de la MLR. Ceci nous permettra de doser les cytokines présentes durant la MLR et de vérifier si elles ont aussi un rôle immunosuppresseur.

## **Chapitre 5 : Conclusion**

Pour terminer, nous avons démontré pour la première fois que les cellules T DN humaines possèdent un rôle immunosuppresseur spécifique aux antigènes auxquels elles ont préalablement été exposées, car elles n'inhibent pas la prolifération des cellules T effectrices en présence d'un donneur inconnu. De plus, elles ne modulent pas l'expression des marqueurs d'activation sur les cellules effectrices. Ceci est très intéressant pour l'utilisation des cellules T DN humaines en thérapie cellulaire clinique. Elles pourraient diminuer la GvH tout en gardant l'effet GvT. Il est donc important de continuer nos expériences afin d'approfondir le mécanisme d'action de ces cellules. Lorsque les cellules T DN sont stimulées par les APCs de la cible, elles expriment un niveau plus élevé de la GrzB que les T DN non-stimulées spécifiquement. Donc, la possibilité que les cellules T DN stimulées spécifiquement induisent l'apoptose des cellules T effectrices n'est pas exclue. Il faudra donc, comme mentionné, que nous vérifions l'apoptose des cellules effectrices plus tôt après le début de la MLR. Nous ne pouvons exclure que les cytokines présentes dans le milieu aient une influence sur le rôle immunosuppresseur des cellules T DN. Il reste donc à étudier le ou les mécanismes impliqués dans la suppression des T DN *in vitro* et *in vivo*.

## **Chapitre 6 : Perspectives**

Au cours de ma maîtrise, l'isolation et l'amplification des cellules T DN à partir de sang périphérique ont permis l'étude de leur rôle immunomodulateur. Les résultats obtenus ont permis d'avancer les connaissances des cellules T DN chez l'humain. Il y a donc confirmation que les cellules T DN régulatrices inhibent la prolifération des cellules T syngéniques effectrices lorsqu'elles sont préalablement stimulées spécifiquement. Par la suite, nous aimerions comprendre le ou les mécanismes d'action entrepris par les cellules T DN pour inhiber les cellules effectrices. Deux voies principales de d'immunosuppression ont été décrites chez les cellules T DN murines, soit la voie Fas-FasL et la voie perforine-GrzB. Il se peut que les cellules T DN utilisent soit un ou deux de ces mécanismes afin d'effectuer leur fonction immunosuppressive. L'expression de Fas et son ligand reste à être vérifié sur les T DN suite à leur stimulation. Par ailleurs, nous devrions aussi doser les cytokines présentes dans le milieu à la fin de la MLR, car il se pourrait que celles-ci soient impliquées dans l'effet inhibiteur des cellules T DN. De plus, nous aimerions développer un modèle de souris xénogénique permettant de vérifier l'effet des cellules T DN stimulées *in vivo*. Il reste à étudier si les T DN stimulées versus non-stimulées ne retarderaient pas l'incidence de la GvH lorsqu'elles sont co-injectées avec des PBMCs dans notre modèle de souris xénogénique. Il serait aussi intéressant d'évaluer si une infusion de lymphocytes du donneur des cellules T DN avant l'administration de PBMCs n'améliorait pas les effets de ces cellules immunosuppressives. En somme, ces cellules peuvent avoir un intérêt dans la thérapie cellulaire de la GvH grâce à leur action immunosuppressive spécifique des cellules T effectrices syngéniques.

## Bibliographie

1. Appelbaum, F.R. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* **357**, 1472-1475 (2007).
2. Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Lu, W.C. & Ferrebee, J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* **257**, 491-496 (1957).
3. Thomas, E.D., Lochte, H.L., Jr., Cannon, J.H., Sahler, O.D. & Ferrebee, J.W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* **38**, 1709-1716 (1959).
4. Shlomchik, W.D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* **7**, 340-352 (2007).
5. Jenq, R.R. & van den Brink, M.R. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 213-221 (2010).
6. Kolb, H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* **112**, 4371-4383 (2008).
7. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* **12**, 197-201 (1951).
8. Berenson, R.J., *et al.* Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* **81**, 951-955 (1988).
9. Bensinger, W.I., *et al.* Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* **344**, 175-181 (2001).
10. Couban, S., *et al.* A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* **100**, 1525-1531 (2002).
11. Cutler, C., *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **19**, 3685-3691 (2001).
12. Eapen, M., *et al.* Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* **22**, 4872-4880 (2004).
13. Knudtson, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* **43**, 357-361 (1974).
14. Gluckman, E., *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178 (1989).
15. Han, P., Hodge, G., Story, C. & Xu, X. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* **89**, 733-740 (1995).
16. Marsh, S.G. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2002. *Tissue Antigens* **59**, 239-240 (2002).
17. Tiercy, J.M., *et al.* Quality control of a national bone marrow donor registry: results of a pilot study and proposal for a standardized approach. *Bone Marrow Transplant* **32**, 623-627 (2003).

18. Klein, J. & Sato, A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 702-709 (2000).
19. Petersdorf, E.W., *et al.* Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* **92**, 3515-3520 (1998).
20. Sasazuki, T., *et al.* Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med* **339**, 1177-1185 (1998).
21. Bain, B., Vas, M.R. & Lowenstein, L. The Development of Large Immature Mononuclear Cells in Mixed Leukocyte Cultures. *Blood* **23**, 108-116 (1964).
22. Bain, B., Maclean, L.D., Lowenstein, L. & Briers, S. In Vitro Test to Detect the Degree of Antigenic Difference between Individuals. *Surg Forum* **15**, 151-152 (1964).
23. Bain, B. & Lowenstein, L. Genetic Studies on the Mixed Leukocyte Reaction. *Science* **145**, 1315-1316 (1964).
24. Bach, F.H. & Reinsmoen, N.L. The role of HLA-DR and HLA-DQ products in T lymphocyte activation and in contributing to "Dw specificities". *Hum Immunol* **16**, 271-275 (1986).
25. Reinsmoen, N.L. & Bach, F.H. Structural model for T-cell recognition of HLA class II-associated alloepitopes. *Hum Immunol* **27**, 51-72 (1990).
26. Hirschhorn, K., Schreiber, R.R., Bach, F.H. & Siltzbach, L.E. In-Vitro Studies of Lymphocytes from Patients with Sarcoidosis and Lymphoproliferative Diseases. *Lancet* **2**, 842-843 (1964).
27. Hardonk, M.J. & Harms, G. The use of 5'-bromodeoxyuridine in the study of cell proliferation. *Acta Histochem Suppl* **39**, 99-108 (1990).
28. Lanier, T.L., Berger, E.K. & Eacho, P.I. Comparison of 5-bromo-2-deoxyuridine and [3H]thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents. *Carcinogenesis* **10**, 1341-1343 (1989).
29. Hawkins, E.D., *et al.* Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc* **2**, 2057-2067 (2007).
30. Jacobsohn, D.A. & Vogelsang, G.B. Acute graft versus host disease. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 35 (2007).
31. Korngold, R. & Sprent, J. Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med* **148**, 1687-1698 (1978).
32. Ruggeri, L., *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **295**, 2097-2100 (2002).
33. Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550-1561 (2009).
34. Ferrara, J.L., Cooke, K.R. & Teshima, T. The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* **78**, 181-187 (2003).
35. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. & Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* **175**, 5-14 (2005).
36. Schmaltz, C., *et al.* Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* **97**, 2886-2895 (2001).

37. Wasem, C., *et al.* Accumulation and activation-induced release of preformed Fas (CD95) ligand during the pathogenesis of experimental graft-versus-host disease. *J Immunol* **167**, 2936-2941 (2001).
38. Socie, G., *et al.* Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and Fas expression. *Blood* **103**, 50-57 (2004).
39. Fowler, D.H., *et al.* Clinical "cytokine storm" as revealed by monocyte intracellular flow cytometry: correlation of tumor necrosis factor alpha with severe gut graft-versus-host disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**, 237-245 (2004).
40. Schmaltz, C., *et al.* Donor T cell-derived TNF is required for graft-versus-host disease and graft-versus-tumor activity after bone marrow transplantation. *Blood* **101**, 2440-2445 (2003).
41. Petersdorf, E.W. Immunogenomics of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol* **18**, 559-564 (2006).
42. Petersdorf, E.W. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol* **20**, 155-170 (2007).
43. Weisdorf, D., *et al.* Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation* **51**, 1197-1203 (1991).
44. Flowers, M.E., *et al.* Previous donor pregnancy as a risk factor for acute graft-versus-host disease in patients with aplastic anaemia treated by allogeneic marrow transplantation. *Br J Haematol* **74**, 492-496 (1990).
45. Miller, K.B., *et al.* A novel reduced intensity regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation associated with a reduced incidence of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* **33**, 881-889 (2004).
46. Couriel, D.R., *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **10**, 178-185 (2004).
47. Atkinson, K. Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* **5**, 69-82 (1990).
48. Deeg, H.J. & Socie, G. Malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: many questions, some answers. *Blood* **91**, 1833-1844 (1998).
49. Gilman, A.L., *et al.* Hydroxychloroquine for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **6**, 327-334 (2000).
50. Lee, S.J., *et al.* Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* **100**, 406-414 (2002).
51. Goerner, M., *et al.* Morbidity and mortality of chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation from HLA-identical siblings for patients with aplastic or refractory anemias. *Biol Blood Marrow Transplant* **8**, 47-56 (2002).
52. Storb, R., *et al.* Predictive factors in chronic graft-versus-host disease in patients with aplastic anemia treated by marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Ann Intern Med* **98**, 461-466 (1983).
53. Atkinson, K., *et al.* Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 2459-2464 (1990).
54. Sullivan, K.M., *et al.* Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood* **57**, 267-276 (1981).

55. Ochs, L.A., *et al.* Predictive factors for chronic graft-versus-host disease after histocompatible sibling donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **13**, 455-460 (1994).
56. Higman, M.A. & Vogelsang, G.B. Chronic graft versus host disease. *Br J Haematol* **125**, 435-454 (2004).
57. Zecca, M., *et al.* Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* **100**, 1192-1200 (2002).
58. Akpek, G., *et al.* Performance of a new clinical grading system for chronic graft-versus-host disease: a multicenter study. *Blood* **102**, 802-809 (2003).
59. Shulman, H.M., *et al.* Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* **69**, 204-217 (1980).
60. Baird, K., Cooke, K. & Schultz, K.R. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am* **57**, 297-322 (2010).
61. Filipovich, A.H., *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**, 945-956 (2005).
62. Storb, R., *et al.* Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials. *Blood* **71**, 293-298 (1988).
63. Storb, R., *et al.* Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med* **314**, 729-735 (1986).
64. Nash, R.A., *et al.* Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* **96**, 2062-2068 (2000).
65. Pavletic, S.Z., *et al.* Influence of T-cell depletion on chronic graft-versus-host disease: results of a multicenter randomized trial in unrelated marrow donor transplantation. *Blood* **106**, 3308-3313 (2005).
66. Slavin, S., *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* **91**, 756-763 (1998).
67. Perez-Simon, J.A., *et al.* Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* **100**, 3121-3127 (2002).
68. Greinix, H.T., *et al.* The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* **91**, 405-408 (2006).
69. Margolis, J. & Vogelsang, G. An old drug for a new disease: pentostatin (Nipent) in acute graft-versus-host disease. *Semin Oncol* **27**, 72-77 (2000).
70. Bolanos-Meade, J., *et al.* Pentostatin in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* **23**, 2661-2668 (2005).
71. Benito, A.I., *et al.* Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation* **72**, 1924-1929 (2001).
72. Couriel, D., *et al.* Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* **104**, 649-654 (2004).
73. Ringden, O., *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited disorders: experience in a single center. *Transplantation* **81**, 718-725 (2006).

74. Bleakley, M. & Riddell, S.R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* **4**, 371-380 (2004).
75. Horowitz, M.M., *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555-562 (1990).
76. Baron, F., *et al.* What is the role for donor natural killer cells after nonmyeloablative conditioning? *Biol Blood Marrow Transplant* **15**, 580-588 (2009).
77. Miklos, D.B., *et al.* Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* **105**, 2973-2978 (2005).
78. Nishida, T., *et al.* Development of tumor-reactive T cells after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* **15**, 4759-4768 (2009).
79. Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W. & Demanet, C. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* **19**, 1446-1451 (2005).
80. Kahl, C., *et al.* Relapse risk in patients with malignant diseases given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* **110**, 2744-2748 (2007).
81. Olson, J.A., *et al.* NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* **115**, 4293-4301 (2010).
82. Marcenaro, E., *et al.* Role of alloreactive KIR2DS1+ NK cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J Leukoc Biol* (2011).
83. Pende, D., *et al.* Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* **113**, 3119-3129 (2009).
84. Yokoyama, W.M., Kim, S. & French, A.R. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* **22**, 405-429 (2004).
85. Shlomchik, W.D., *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412-415 (1999).
86. Rabinovich, B.A., *et al.* Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* **170**, 3572-3576 (2003).
87. Cerboni, C., *et al.* Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* **110**, 606-615 (2007).
88. Sanos, S.L., *et al.* RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* **10**, 83-91 (2009).
89. Carayannopoulos, L.N., *et al.* Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol* **32**, 597-605 (2002).
90. Diefenbach, A., Hsia, J.K., Hsiung, M.Y. & Raulet, D.H. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* **33**, 381-391 (2003).
91. Cerwenka, A., *et al.* Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* **12**, 721-727 (2000).
92. Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736 (2008).

93. Tolar, J., Le Blanc, K., Keating, A. & Blazar, B.R. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* **28**, 1446-1455 (2010).
94. Di Nicola, M., *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838-3843 (2002).
95. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. & Ringden, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **31**, 890-896 (2003).
96. Maitra, B., *et al.* Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* **33**, 597-604 (2004).
97. Ren, G., *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141-150 (2008).
98. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E. & Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **57**, 11-20 (2003).
99. Tolar, J., Villeneuve, P. & Keating, A. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease. *Hum Gene Ther* **22**, 257-262 (2011).
100. Bartholomew, A., *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* **30**, 42-48 (2002).
101. Guo, Z., *et al.* In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* **24**, 992-1000 (2006).
102. Aksu, A.E., *et al.* Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol* **127**, 348-358 (2008).
103. Tisato, V., Naresh, K., Girdlestone, J., Navarrete, C. & Dazzi, F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* **21**, 1992-1999 (2007).
104. Li, H., *et al.* Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells* **26**, 2531-2541 (2008).
105. Sudres, M., *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* **176**, 7761-7767 (2006).
106. Badillo, A.T., Peranteau, W.H., Heaton, T.E., Quinn, C. & Flake, A.W. Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **141**, 224-234 (2008).
107. Prigozhina, T.B., *et al.* Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol* **36**, 1370-1376 (2008).
108. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. & Frolova, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247 (1968).
109. Baddoo, M., *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* **89**, 1235-1249 (2003).
110. Hillhouse, E.E., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Dugas, V. & Lesage, S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* **88**, 771-780 (2010).

111. Fischer, K., *et al.* Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**, 2828-2835 (2005).
112. Zhang, Z.X., Yang, L., Young, K.J., DuTemple, B. & Zhang, L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* **6**, 782-789 (2000).
113. Hippen, K.L., Riley, J.L., June, C.H. & Blazar, B.R. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin Immunol* (2011).
114. Hippen, K.L., *et al.* Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant* **11**, 1148-1157 (2011).
115. Godfrey, W.R., *et al.* In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* **104**, 453-461 (2004).
116. Hippen, K.L., *et al.* Umbilical cord blood regulatory T-cell expansion and functional effects of tumor necrosis factor receptor family members OX40 and 4-1BB expressed on artificial antigen-presenting cells. *Blood* **112**, 2847-2857 (2008).
117. Hippen, K.L., *et al.* Massive ex vivo expansion of human natural regulatory T cells (T(regs)) with minimal loss of in vivo functional activity. *Sci Transl Med* **3**, 83ra41 (2011).
118. Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626-635 (2009).
119. Golovina, T.N., *et al.* Retinoic acid and rapamycin differentially affect and synergistically promote the ex vivo expansion of natural human T regulatory cells. *PLoS One* **6**, e15868 (2011).
120. Mold, J.E., *et al.* Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* **322**, 1562-1565 (2008).
121. Tran, D.Q., Ramsey, H. & Shevach, E.M. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* **110**, 2983-2990 (2007).
122. Godebu, E., Summers-Torres, D., Lin, M.M., Baaten, B.J. & Bradley, L.M. Polyclonal adaptive regulatory CD4 cells that can reverse type I diabetes become oligoclonal long-term protective memory cells. *J Immunol* **181**, 1798-1805 (2008).
123. Selvaraj, R.K. & Geiger, T.L. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *J Immunol* **180**, 2830-2838 (2008).
124. Kang, S.G., Lim, H.W., Andrisani, O.M., Broxmeyer, H.E. & Kim, C.H. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* **179**, 3724-3733 (2007).
125. Lu, L., Zhou, X., Wang, J., Zheng, S.G. & Horwitz, D.A. Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF-beta and retinoic acid. *PLoS One* **5**, e15150 (2010).
126. Bacchetta, R., *et al.* High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **179**, 493-502 (1994).
127. Zeller, J.C., *et al.* Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* **163**, 3684-3691 (1999).

128. Crispin, J.C. & Tsokos, G.C. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol* **183**, 4675-4681 (2009).
129. Young, K.J., DuTemple, B., Phillips, M.J. & Zhang, L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* **171**, 134-141 (2003).
130. Young, K.J. & Zhang, L. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum Immunol* **63**, 926-934 (2002).
131. Strober, S. Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships. *Annu Rev Immunol* **2**, 219-237 (1984).
132. Hertel-Wulff, B., Okada, S., Oseroff, A. & Strober, S. In vitro propagation and cloning of murine natural suppressor (NS) cells. *J Immunol* **133**, 2791-2796 (1984).
133. Schwadron, R.B., Gandour, D.M. & Strober, S. Cloned natural suppressor cell lines derived from the spleens of neonatal mice. *J Exp Med* **162**, 297-310 (1985).
134. Argyris, B.F. Suppressor activity in the spleen of neonatal mice. *Cell Immunol* **36**, 354-362 (1978).
135. Peeler, K., Wigzell, H. & Peck, A.B. Isolation and identification of the naturally occurring, newborn spleen-associated suppressor cells. A mixed monocyte/mast cell population with separable suppressor activities. *Scand J Immunol* **17**, 443-453 (1983).
136. Strober, S., Hertel-Wulff, B. & Schwadron, R.B. Role of natural suppressor cells in bone marrow transplantation. *Transplant Proc* **19**, 88-94 (1987).
137. Strober, S., Palathumpat, V., Schwadron, R. & Hertel-Wulff, B. Cloned natural suppressor cells prevent lethal graft-vs-host disease. *J Immunol* **138**, 699-703 (1987).
138. Hertel-Wulff, B., *et al.* Rearrangement and expression of T cell receptor genes in cloned murine natural suppressor cell lines. *J Exp Med* **166**, 1168-1173 (1987).
139. Strober, S., *et al.* Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol* **143**, 1118-1122 (1989).
140. Young, K.J., Yang, L., Phillips, M.J. & Zhang, L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* **100**, 3408-3414 (2002).
141. Zhang, Z.X., *et al.* Adoptive transfer of DNT cells induces long-term cardiac allograft survival and augments recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cell accumulation. *Transpl Immunol* **24**, 119-126 (2011).
142. Priatel, J.J., Utting, O. & Teh, H.S. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol* **167**, 6188-6194 (2001).
143. Reimann, J. Double-negative (CD4-CD8-), TCR alpha beta-expressing, peripheral T cells. *Scand J Immunol* **34**, 679-688 (1991).
144. Kusunoki, Y., Hirai, Y., Kyoizumi, S. & Akiyama, M. Evidence for in vivo clonal proliferation of unique population of blood CD4-/CD8- T cells bearing T-cell receptor alpha and beta chains in two normal men. *Blood* **79**, 2965-2972 (1992).
145. Wirt, D.P., *et al.* Novel T-lymphocyte population in combined immunodeficiency with features of graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **321**, 370-374 (1989).
146. Fisher, G.H., *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935-946 (1995).

147. McIver, Z., *et al.* Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* **141**, 170-178 (2008).
148. Sha, W.C., *et al.* Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* **336**, 73-76 (1988).
149. Dugas, V., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Hillhouse, E.E. & Lesage, S. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* **35**, 23-32 (2010).
150. Rea, I.M., McNerlan, S.E. & Alexander, H.D. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol* **34**, 79-93 (1999).
151. Kaplan, R.C., *et al.* T cell activation and senescence predict subclinical carotid artery disease in HIV-infected women. *J Infect Dis* **203**, 452-463 (2011).
152. Viillard, J.F., *et al.* HLA-DR expression on lymphocyte subsets as a marker of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **125**, 485-491 (2001).
153. Saito, S., *et al.* Expression of activation antigens CD69, HLA-DR, interleukin-2 receptor-alpha (IL-2R alpha) and IL-2R beta on T cells of human decidua at an early stage of pregnancy. *Immunology* **75**, 710-712 (1992).
154. Caruso, A., *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry* **27**, 71-76 (1997).
155. Kaplan, R.C., *et al.* T cell activation predicts carotid artery stiffness among HIV-infected women. *Atherosclerosis* (2011).
156. Santis, A.G., *et al.* Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol* **22**, 1253-1259 (1992).
157. Theze, J., Alzari, P.M. & Bertoglio, J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* **17**, 481-486 (1996).
158. Jacobson, M.D., Weil, M. & Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354 (1997).
159. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51 (1995).
160. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R. & Lascurain, R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* **6**, 15-25 (2009).
161. Niu, G. & Chen, X. Apoptosis imaging: beyond annexin V. *J Nucl Med* **51**, 1659-1662 (2010).
162. Barry, M. & Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401-409 (2002).
163. Carrington, P.E., *et al.* The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* **22**, 599-610 (2006).
164. Kroemer, G. & Martin, S.J. Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**, 725-730 (2005).
165. Lettau, M., Paulsen, M., Schmidt, H. & Janssen, O. Insights into the molecular regulation of FasL (CD178) biology. *Eur J Cell Biol* **90**, 456-466 (2011).

166. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
167. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
168. Wiley, S.R., *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**, 673-682 (1995).
169. Pan, G., *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111-113 (1997).
170. Walczak, H., *et al.* TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* **16**, 5386-5397 (1997).
171. Sprick, M.R., *et al.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**, 599-609 (2000).
172. Muppidi, J.R., *et al.* Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 1641-1650 (2006).
173. Russell, J.H. & Ley, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323-370 (2002).
174. Cullen, S.P. & Martin, S.J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* **15**, 251-262 (2008).
175. Fehniger, T.A., *et al.* Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* **26**, 798-811 (2007).
176. Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A. & Ley, T.J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* **10**, 581-587 (1998).
177. Geiger, B., Rosen, D. & Berke, G. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol* **95**, 137-143 (1982).
178. Kupfer, A. & Dennert, G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* **133**, 2762-2766 (1984).
179. Kupfer, A., Dennert, G. & Singer, S.J. The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol* **2**, 37-49 (1985).
180. Podack, E.R., Young, J.D. & Cohn, Z.A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8629-8633 (1985).
181. Voskoboinik, I., Smyth, M.J. & Trapani, J.A. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **6**, 940-952 (2006).
182. Peters, P.J., *et al.* Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* **173**, 1099-1109 (1991).
183. Voskoboinik, I., *et al.* Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* **280**, 8426-8434 (2005).
184. Liu, C.C., Walsh, C.M. & Young, J.D. Perforin: structure and function. *Immunol Today* **16**, 194-201 (1995).

185. Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S. & Peters, R. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim Biophys Acta* **1063**, 137-146 (1991).
186. Motyka, B., *et al.* Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491-500 (2000).
187. Froelich, C.J., *et al.* New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 29073-29079 (1996).
188. Metkar, S.S., *et al.* Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* **16**, 417-428 (2002).
189. Raja, S.M., *et al.* Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* **277**, 49523-49530 (2002).
190. Grujic, M., *et al.* Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem* **280**, 33411-33418 (2005).
191. Osman, N., Ley, S.C. & Crumpton, M.J. Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **22**, 2995-3000 (1992).
192. Zhang, Z.X., *et al.* Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol* **177**, 6920-6929 (2006).
193. Munk, R.B., *et al.* Antigen-Independent IFN-gamma Production by Human Naive CD4 T Cells Activated by IL-12 Plus IL-18. *PLoS One* **6**, e18553 (2011).
194. Kohler, S. & Thiel, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* **113**, 769-774 (2009).
195. Kaech, S.M., *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* **4**, 1191-1198 (2003).
196. Bradley, L.M., Atkins, G.G. & Swain, S.L. Long-term CD4+ memory T cells from the spleen lack MEL-14, the lymph node homing receptor. *J Immunol* **148**, 324-331 (1992).
197. Montaville, P., Neumann, J.M., Russo-Marie, F., Ochsenbein, F. & Sanson, A. A new consensus sequence for phosphatidylserine recognition by annexins. *J Biol Chem* **277**, 24684-24693 (2002).
198. Jung, U., Foley, J.E., Erdmann, A.A., Eckhaus, M.A. & Fowler, D.H. CD3/CD28-costimulated T1 and T2 subsets: differential in vivo allosensitization generates distinct GVT and GVHD effects. *Blood* **102**, 3439-3446 (2003).
199. D'Ambrosio, D., *et al.* Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals. *Eur J Immunol* **23**, 2993-2997 (1993).
200. Grossman, W.J., *et al.* Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589-601 (2004).
201. Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. & Noelle, R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* **174**, 1783-1786 (2005).

202. Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. & Shevach, E.M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925-3932 (2006).

