

Université de Montréal

**Impact de la maladie du greffon contre l'hôte sur la
reconstitution immunitaire suite à une greffe de moelle
osseuse allogénique**

par

Simon-David Gauthier

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

Août 2011

© Simon-David Gauthier, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Impact de la maladie du greffon contre l'hôte sur la
reconstitution immunitaire suite à une greffe de moelle
osseuse allogénique**

Présenté par :

Simon-David Gauthier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Sabbagh, président-rapporteur

Dr Martin Guimond, directeur de recherche

Dr Michel Duval, membre du jury

Résumé

La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques est une technique très efficace pour traiter différents cancers du sang. Malheureusement la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) demeure la cause principale de morbidité et de mortalité post-greffe. La GVHD entraîne une diminution de la reconstitution immunitaire ce qui accentue considérablement l'immunosuppression associée à ce traitement et de ce fait augmente les risques d'infection et de rechute.

Notre laboratoire a démontré précédemment que les niveaux élevés d'IL-7 dans des hôtes lymphopéniques interféraient avec la capacité des cellules dendritiques (DC) à soutenir la prolifération homéostatique (PH) des lymphocytes T CD4⁺. Puisque les niveaux d'IL-7 sont aussi élevés dans un contexte de GVHD, nous avons émis l'hypothèse que la signalisation de l'IL-7 sur les DC pouvait contribuer à diminuer la reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle murin de GVHD C57BL/6 (B6) dans B6D2F₁. Afin de régénérer une niche hématopoïétique permissive à la PH des lymphocytes T CD4⁺, nous avons transplanté des souris B6D2F₁ avec de la moelle osseuse de souris B6 IL-7Rα^{-/-}. La GVHD a été induite en transférant des lymphocytes T B6 réactifs aux cellules B6D2F₁. Dans les souris contrôles, la PH des lymphocytes T CD4⁺ est maintenue. Par contre, la PH est absente dans les souris en GVHD malgré la présence d'une niche périphérique qui ne répond pas à l'IL-7. L'absence de PH des lymphocytes T CD4⁺ durant la GVHD est associée à une diminution du nombre de DC. En utilisant un test de cytotoxicité *in vivo* nous démontrons que les DC B6 générées dans une hôte B6D2F₁ sont éliminées par les lymphocytes T B6 alloréactifs.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'immunosuppression associée à la GVHD est en partie causée par une élimination des DC par les lymphocytes T allogéniques. Nous postulons donc que la perte des DC, et non la signalisation de l'IL-7 sur les DC, est le facteur limitant la PH des lymphocytes T CD4⁺ durant la GVHD.

Mots clés : GVHD, reconstitution immunitaire, lymphocyte T CD4⁺, cellule dendritique, prolifération homéostatique.

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT) is an effective treatment for numerous types of haematological malignancies. However, graft-versus-host disease (GVHD) remains the major cause of morbidity and mortality following SCT. GVHD is associated with poor immune reconstitution and its adverse effect on T cell regeneration greatly exaggerates the immunodeficiency normally associated with SCT. As a result, patients experiencing GVHD present deficit in T cells that can last for several years.

Our laboratory has demonstrated that elevated systemic IL-7 found during lymphopenia can interfere with the capacity of dendritic cells (DC) to support the homeostatic proliferation (HP) of CD4⁺ T cells. Since IL-7 levels are also elevated during GVHD, we hypothesized that IL-7 signaling in DC could also contribute to diminished T cell reconstitution in this setting. We used the well describe GVHD mouse model C57BL/6 (B6) into B6D2F₁ to study the contribution of IL-7 signalling in DC on CD4⁺ T cell regeneration during GVHD. To regenerate a peripheral niche permissive for CD4⁺ T cells HP, we transplanted B6D2F₁ mice with bone marrow (BM) from B6 IL-7R α ^{-/-} mice. Finally, GVHD was induced with 1x10⁶ of alloreactive B6 T cells. In control mice transplanted with IL-7R α ^{-/-} BM cells, CD4⁺ T cells HP is efficiently supported. In contrast, CD4⁺ HP is completely abrogated in GVHD mice despite the presence of a peripheral niche that does not signal IL-7. Loss of CD4⁺ HP during GVHD was associated with diminished number of DC. Using an *in vivo* cytotoxic assay, we demonstrated that B6 DC can be eliminated by alloreactive B6 T cells when these cells developed into B6D2F₁ hosts.

In conclusion, our data demonstrates that the immunosuppression associated with GVHD is in part related to the elimination of donor-derived DC by donor alloreactive T cells. Therefore, we postulate that loss of DC, and not IL-7 signaling in DC, represents the limiting factor that contains CD4⁺ HP during GVHD.

Keywords: Graft-versus-host disease, immune reconstitution, CD4⁺ T cells, dendritic cells, homeostatic proliferation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Introduction.....	1
1. Homéostasie des lymphocytes T.....	2
1.1 Le système immunitaire.....	2
1.2 La thymopoïèse.....	3
1.3 Homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	4
1.3.1 La signalisation du TCR dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	5
1.3.2 L'interleukine-7 dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs.....	7
1.4 Lymphopénie et prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs.....	9
1.4.1 Prolifération homéostatique par le complexe peptide du soi-CMH et l'interleukine-7.....	9
1.4.2 Prolifération homéostatique par d'autres cytokines.....	11
1.4.3 Prolifération homéostatique par des antigènes commensaux.....	12
1.5 Homéostasie des lymphocytes T mémoires.....	13
1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T CD8 ⁺ mémoires.....	13
1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T CD4 ⁺ mémoires.....	14

2. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et maladie du greffon contre l'hôte	14
2.1 Les débuts de la greffe de moelle osseuse	14
2.2 La greffe de moelle osseuse pour traiter des cancers	16
2.3 Modèles animaux	18
2.4 Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)	20
2.4.1 Pathophysiologie de la GVHD aiguë	21
2.4.1.1 APC et présentation antigénique	22
2.4.1.2 Sous-type de lymphocytes T impliqués	24
2.4.1.3 Importance de la costimulation	24
2.4.1.4 Migration des lymphocytes T	25
2.4.1.5 Fonctions effectrices des lymphocytes T	26
2.4.2 Pathophysiologie de la GVHD chronique	27
2.5 GVL et contrôle de la GVHD	29
2.5.1 La réaction du greffon contre la leucémie (GVL)	29
2.5.2 Prophylaxie de la GVHD	30
2.5.3 Traitement de la GVHD	31
2.6 Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et reconstitution immunitaire	32
2.6.1 Reconstitution des lymphocytes T	32
2.6.2 Reconstitution des lymphocytes T CD4 ⁺	34
3. Hypothèse et objectifs	36
3.1 Hypothèse	36
3.2 Objectifs	36

Matériels et méthodes	35
4.1 Souris	36
4.2 Greffe de moelle osseuse et GVHD	36
4.3 Cytométrie en flux	36
4.4 Marquage au CFSE et transfert adoptif des lymphocytes T	37
4.5 Cytotoxicité in vivo.....	37
4.6 Statistiques	38
Résultats	39
5.1 L'absence du récepteur à l'IL-7 sur les cellules hématopoïétiques n'influence pas la sévérité de la GVHD	40
5.2 La GVHD diminue la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 ⁺	42
5.3 L'absence de prolifération homéostatique n'est pas due à une mauvaise prise du greffon.....	45
5.4 La GVHD entraîne une diminution du nombre de cellules dendritiques 35 jours post- greffe	47
5.5 Les cellules dendritiques du donneur générées dans le receveur peuvent être détruites suite au transfert de lymphocytes T du donneur	49
5.6 Les cellules dendritiques du donneur générées dans le receveur sont éliminées dans les souris en GVHD.....	52
Discussion	54
6.1 Influence du milieu sur la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 ⁺	55
6.2 Diminution des cellules dendritiques dans un hôte en GVHD	57
6.3 Diminution des cellules dendritiques due à une mauvaise reconstitution ?.....	59
6.4 Impact clinique de l'absence des lymphocytes T CD4 ⁺	61

6.5 Impact clinique de l'absence des cellules dendritiques.....	63
Conclusion	65
Références.....	68

Liste des figures

Figure 1 : Différenciation des lymphocytes T au niveau du thymus.	3
Figure 2 : Voie de signalisation de l'IL-7R.	8
Figure 3 : Lien entre les niveaux élevés d'IL-7 systémiques et l'expression du CMH II sur les DC dans la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs	11
Figure 4: Courbe de survie après une greffe de moelle chez le chien.....	17
Figure 5 : Étapes de la GVHD aiguë chez la souris.....	23
Figure 6 : Étapes de la GVHD chronique chez la souris	28
Figure 7 : Probabilité de rechute leucémique après une greffe de moelle osseuse allogénique dépendamment du type de greffe et de GVHD	30
Figure 8: Nombre de lymphocytes T par microlitre de sang chez des patients ayant reçu une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques.....	33
Figure 9 : GVHD et survie des souris	41
Figure 10 : Prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4 ⁺ anti-HY.	44
Figure 11: Chimérisme donneur-receveur des souris B6D2F ₁ au jour +35 post-greffe.	46
Figure 12 : Analyse des cellules dendritiques au jour +35 post-greffe.....	48
Figure 13: Élimination des cellules dendritiques suite au transfert de lymphocytes T alloréactifs.....	51
Figure 14: Cytotoxicité <i>in vivo</i> des cellules dendritiques dans les souris en GVHD.....	53

Liste des abréviations

APC	Antigen presenting cell / cellules présentatrices d'antigènes
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
CCR	C-C chemokine receptor
CCL	C-C chemokine ligand
CD40L	CD40 ligand
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	Cellules dendritiques
cDC	Cellules dendritiques conventionnelles
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
DLA	Dog leukocyte antigen
DN	Double négatif
DP	Double positif
Eomes	Eomesodermin
FasL	Fas ligand
FL	Fms-related tyrosine kinase-3 ligand
GVHD	Graft-versus-host disease / Maladie du greffon contre l'hôte
GVT	Graft-versus-tumor / Greffon contre la tumeur
HLA	Human leukocyte antigen
ICOS	Inducible costimulator
IFN γ	Interféron gamma
IL-	Interleukine
IL-7R	Récepteur de l'interleukine-7
IL-7R α	Chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-7
JAK	Janus kinase
KGF	Keratinocyte growth factor
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T

Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence-1
miHA	Antigène mineur d'histocompatibilité
MO	Moelle osseuse
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NK	Natural killer
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern / Molécule associée aux pathogènes
PD-1	Program death-1
PH	Prolifération homéostatique
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
psCMH	Complexe peptide du soi + CMH
Rag	Recombination-activating gene
STAT	Signal transducer and activator of transcription 5
Tm	Lymphocyte T mémoire
Tn	Lymphocyte T naïf
TCR	T-cell receptor / Récepteur des cellules T
Th	Helper T cell
TLR	Toll like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Treg	Lymphocytes T régulateur

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Dr. Martin Guimond. Sa bonne humeur et son dynamisme créent une ambiance de travail des plus agréables pour tous les membres du laboratoire. Son soutien pour le projet pendant les deux dernières années a été très précieux.

Je remercie également mes collègues Dominique Leboeuf et Olga Hennion-Tscheltzoff pour leur aide. À Olga, je souhaite bonne chance dans ses nouvelles études; avec Dominique, nous continuons notre collaboration fructueuse.

Un merci particulier aux Dr. Jean-Sébastien Delisle et Martin Giroux qui m'ont fait découvrir les joies et les surprises de la recherche.

Finalement, je remercie mes amis et ma famille pour leur soutien, principalement mes parents qui, je le sais, sont très fiers de leur fils immunologiste, et qui sont toujours prêts à m'encourager.

*N'est-ce pas dans le rêve cependant que naissent la plupart
des projets qui en valent la peine ?*

René Lévesque (1922-1987)

Introduction

Le développement de la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques a permis à la médecine de faire un bond en avant dans le domaine de l'hémo-oncologie. Malheureusement, les succès de cette technique sont restreints par la maladie du greffon contre l'hôte qui demeure la première cause de morbidité et de mortalité post-greffe. Bien que l'on puisse diminuer la gravité de la maladie du greffon contre l'hôte à l'aide d'immunosuppresseurs, cette maladie empêche la reconstitution normale du système immunitaire.

L'objectif du travail contenu dans ce mémoire était de comprendre comment la maladie du greffon contre l'hôte affecte la reconstitution du système immunitaire, principalement la reconstitution des lymphocytes T CD4⁺.

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

1. Homéostasie des lymphocytes T

1.1 Le système immunitaire

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

1.2 La thymopoïèse

La génération de lymphocytes T dans un contexte post-natal commence au moment où les cellules souches hématopoïétiques migrent de la MO vers le thymus (Miller, 2011) (Figure 1). Ces cellules progénitrices thymiques (Early Thymic Progenitors, ETP) une fois dans le thymus font partie de la population des cellules double négatives (DN) car elles n'expriment pas les corécepteurs CD4 et CD8. Les DN subissent une maturation thymique qui mène au réarrangement de la chaîne bêta du récepteur des cellules T (T cell receptor, TCR) qui survient au stade DN3. L'expression du TCR entraîne la différenciation des DN en cellules doubles positives (DP) caractérisées par l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Ces DP doivent passer par deux processus de sélection afin de devenir matures et survivre. La sélection positive s'assure que les thymocytes générés peuvent reconnaître les molécules de classe I ou II. La sélection négative va, par la suite, éliminer les thymocytes qui possèdent un TCR qui reconnaît trop fortement les peptides du soi présentés par les molécules du CMH de classe I ou II (Starr et al., 2003). Ces deux étapes permettent d'avoir un répertoire lymphocytaire diversifié qui pourra être utile à l'individu en reconnaissant les antigènes étrangers.

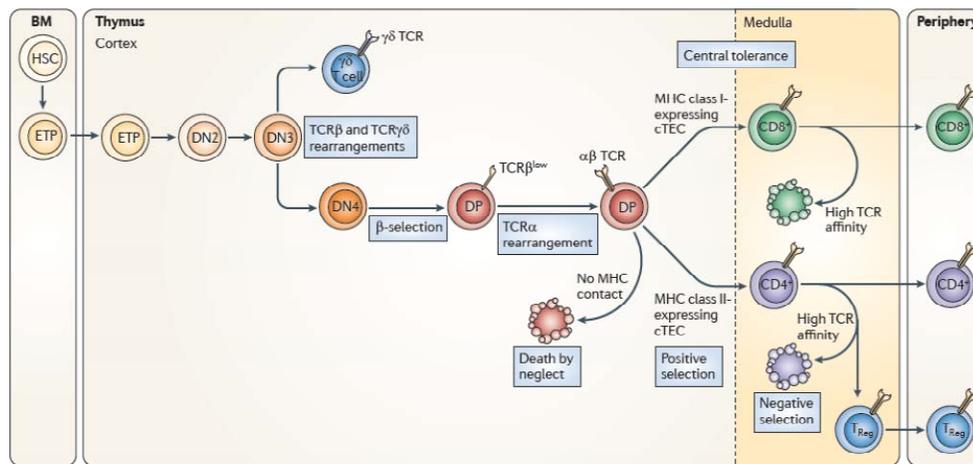


Figure 1 : Différenciation des lymphocytes T au niveau du thymus. Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en cellules progénitrices thymiques (ETP) qui migrent vers le thymus et se différencient en lymphocytes T immatures double négatifs $CD4^-CD8^-$ (DN) puis double positifs $CD4^+CD8^+$ (DP). Ces lymphocytes vont devenir matures et simple positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$ (SP) suite aux processus de sélections positive et négative (Miller, 2011).

Une fois ces processus de sélection franchis, les lymphocytes T matures se retrouvent en périphérie et survivent sans proliférer pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (Sprent et Tough, 1994). Chez la souris, ces lymphocytes T matures sont considérés comme étant naïfs ($CD44^{lo}CD62L^{hi}CCR7^{hi}$) puisqu'ils n'ont pas encore rencontré un antigène étranger. Ces cellules dépendent de deux signaux pour survivre: un signal provenant de cytokines, principalement l'IL-7, et un signal provenant de l'interaction entre le TCR et le CMH + peptide du soi (psCMH) (Surh et Sprent, 2008; Takada et Jameson, 2009). À la suite d'une réponse immunitaire, la majorité des lymphocytes T naïfs (Tn) qui ont réagi à un antigène va mourir par apoptose. Une faible proportion de ces cellules va survivre et se différencier en lymphocytes T mémoires (Tm). Encore aujourd'hui, les mécanismes qui mènent à la formation des lymphocytes T mémoires ne sont pas encore bien compris (Tanel et al., 2009). Contrairement aux Tn, les Tm expriment le CD44. De plus, les Tm peuvent être divisés en deux populations distinctes, les Tm centraux ($CD44^{hi}CD62L^{hi}CCR7^{hi}$) et les Tm effecteurs ($CD44^{hi}CD62L^{lo}CCR7^{lo}$) (Tanel et al., 2009). Les Tm centraux se situent surtout au niveau des ganglions lymphatiques et lors de la rencontre avec leur antigène acquièrent des fonctions effectrices et prolifèrent rapidement. Les Tm effecteurs quant à eux se situent plutôt dans les tissus périphériques et possèdent déjà des fonctions effectrices bien qu'ils ne puissent pas proliférer autant que les Tm centraux.

1.3 Homéostasie des lymphocytes T naïfs

L'homéostasie est, de manière générale, un processus de régulation par lequel un organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur dans les limites des valeurs physiologiques en dépit des contraintes extérieures. L'homéostasie des lymphocytes T est donc le processus qui permet de maintenir leur nombre et leur diversité dans le corps humain.

Une fois sortis du thymus, les Tn demeurent en périphérie au stade d'interphase et peuvent subsister plusieurs semaines en absence de stimulation antigénique (Sprent et Tough, 1994). Cependant, l'arrêt ou la surexpression des signaux d'homéostasie peut modifier leur stade de survie.

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

L'importance de la signalisation par le TCR dans l'homéostasie des lymphocytes T naïfs fut mise en évidence lorsqu'on démontra que la survie des Tn CD8⁺ et CD4⁺ était diminuée quand on les privait du contact avec leur ligand psCMH exprimé à la surface des cellules dendritiques (DC) en les transférant dans des souris déficientes en complexe majeur d'histocompatibilité (CMHI^{-/-} et CMHII^{-/-}) (Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997). L'utilisation de systèmes génétiquement modifiés et inductibles est venue confirmer cette idée en démontrant que l'abolition de l'expression du TCR, ou de sa voie de signalisation proximale, entraîne une diminution significative de la survie des Tn CD4⁺ et CD8⁺ (Labrecque et al., 2001; Seddon et Zamoyska, 2002). Ainsi, la survie des Tn en périphérie dépend en partie d'une interaction entre le TCR et psCMH exprimé à la surface des DC. Ces cellules chez la souris sont divisées en deux groupes principaux, les DC conventionnelles (cDC) pouvant être divisées en DC lymphoïdes (CD11c⁺CD11b⁻) ou myéloïdes (CD11c⁺CD11b⁺), et les DC plasmacytoïdes (pDC) (CD11c⁺CD11b⁻B220⁺mPDCA⁺) (Vremec et Shortman, 1997; Facchetti et al., 2003). Les cDC sont des cellules spécialisées dans le traitement et la présentation des antigènes (Banchereau et Steinman, 1998). Elles détiennent une forte activité phagocytaire lorsqu'elles sont immatures, et sont capables de produire des cytokines une fois matures. Leur rôle principal est de réguler la réponse lymphocytaire T que ce soit à l'état basal ou durant une infection. Les pDC sont quant à elles spécialisées dans la réponse antivirale lors de laquelle elles peuvent sécréter des quantités importantes d'interféron de type 1 (Colonna et al., 2004). Cependant, elles ont aussi la possibilité de présenter des antigènes et de contrôler la réponse lymphocytaire T (Colonna et al., 2004). Curieusement, le rôle que chaque sous-type pourrait jouer dans l'homéostasie des lymphocytes T n'est pas clairement défini.

Des études permettent de croire qu'il existerait une certaine compétition entre les lymphocytes T (compétition intraclonale) (Moses et al., 2003; Troy et Shen, 2003; Leitão et al., 2009). Plus précisément, des lymphocytes T avec un TCR de même spécificité interagiraient avec les mêmes complexes psCMH tandis que des lymphocytes T de spécificité différente interagiraient avec des complexes psCMH différents. De cette façon, l'abondance de psCMH et la compétition entre les lymphocytes T de même spécificité contrôleraient la taille de la population lymphocytaire capable d'interagir avec ce ligand.

L'importance de la compétition intraclonale a d'ailleurs été démontrée en observant que la survie lymphocytaire était inversement proportionnelle au nombre de cellules injectées au départ (Hataye et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, d'autres études permettent de croire qu'il puisse exister une certaine hiérarchie dans la compétition entre les lymphocytes T (Kieper et al., 2004; Hao et al., 2006). La diversité des ligands psCMH avec lesquels pourrait interagir un TCR offrirait à certains lymphocytes T un avantage clonal. La signalisation par le TCR est donc nécessaire à la survie des Tn et permettrait de maintenir un nombre optimal de lymphocytes T de même spécificité pour assurer de cette façon une diversité du répertoire.

Grâce aux études effectuées dans des souris ne détenant qu'un seul complexe psCMH, on croit maintenant que la sélection dans le thymus d'un TCR de faible affinité pour les peptides du soi (sélection positive) permet aux Tn une fois en périphérie d'interagir continuellement avec ces mêmes peptides (Ernst et al., 1999). Cette interaction, conjointement avec la signalisation de l'IL-7, leur permettrait de survivre en périphérie.

Finalement, d'autres études démontrent dans le même ordre d'idée que les lymphocytes T désensibilisent leur TCR avant d'entrer dans les organes lymphoïdes secondaires en périphérie (Grossman et Paul, 2001; Wong et al., 2001; Modiano et al., 2008). Cet ajustement diminuerait l'intensité du signal du TCR et serait important pour les lymphocytes T ayant une affinité un peu trop forte pour les peptides du soi en les maintenant à un stade de quiescence et de tolérance. L'ajustement du TCR chez les lymphocytes de forte affinité implique la surexpression de molécules limitant la réponse TCR comme Cbl-b, SHP-1 et CD5. Certaines de ces cellules de forte affinité pourraient d'ailleurs être sensibles à la prolifération homéostatique induite par les cytokines chez un hôte lymphopénique, ce qui expliquerait la prédisposition aux développements de maladies auto-immunes par réaction croisée suite à une lymphopénie (King et al., 2004; Krupica et al., 2006).

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

L'importance de facteurs solubles dans le maintien de l'homéostasie des Tn a été démontrée par la capacité de certaines cytokines à promouvoir la survie de ces cellules lors de cultures *in vitro* (Vella et al., 1997; Rathmell et al., 2001). L'interleukine-7 (IL-7) est considérée comme la cytokine homéostatique principale et essentielle à la survie des Tn. En effet, l'absence de signalisation de l'IL-7, soit par le transfert de lymphocytes T dans un hôte dépourvu d'IL-7 ou l'injection d'anticorps anti-IL-7, réduit le nombre et la survie des Tn (Vivien et al., 2001). À l'inverse, la surexpression de l'IL-7 augmente le nombre de Tn (Mertsching et al., 1995).

L'IL-7 est produite principalement par les cellules stromales et épithéliales de la moelle osseuse, du thymus et des organes lymphoïdes secondaires. Elle joue un rôle clé dans le développement des lymphocytes B et T au niveau de la moelle osseuse et du thymus et est essentielle à la survie des Tn dans les organes lymphoïdes secondaires. L'IL-7 est produite à dose relativement constante et demeure au site de production où elle est attachée à la matrice extracellulaire (Banwell et al., 2000). Le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) est composé d'une chaîne alpha unique (IL-7R α ou CD127) et de la chaîne gamma du récepteur commun de cytokines (γ c ou CD132) qui est partagée par les récepteurs de l'IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Jiang et al., 2005).

Le signal de survie induit par la fixation de l'IL-7 se fait via l'activation des protéines JAK1 et JAK3 (Janus kinase) qui sont liées respectivement aux portions intracellulaires de l'IL-7R α et de la chaîne γ c (Surh et Sprent, 2008; Takada et Jameson, 2009) (Figure 2). JAK1 et JAK3 recrutent ensuite la protéine STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) qui se dimérise pour ensuite migrer au noyau de la cellule et réguler la transcription de gènes. La délétion de l'IL-7R α , de la chaîne γ c, de JAK3 ou de STAT5 entraîne des déficits sévères en lymphocytes T (Yao et al., 2006). En effet, l'IL-7 soutient la survie des lymphocytes T en régulant l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et MCL1 et en inhibant l'expression de facteurs pro-apoptotiques Bid, Bad et Bim (Surh et Sprent, 2008).

L'IL-7 contrôle aussi le métabolisme des Tn en signalant via la voie de phosphoinositide 3 kinase (PI3K) pour permettre le recrutement de mTOR « mammalian target of rapamycin »

et réguler l'expression du transporteur de glucose GLUT1 (Wofford et al., 2008). Finalement, l'IL-7 peut influencer la migration et le cycle cellulaire des lymphocytes T via la voie PI3K/AKT et l'inhibition de FOXO1 (Sinclair et al., 2008).

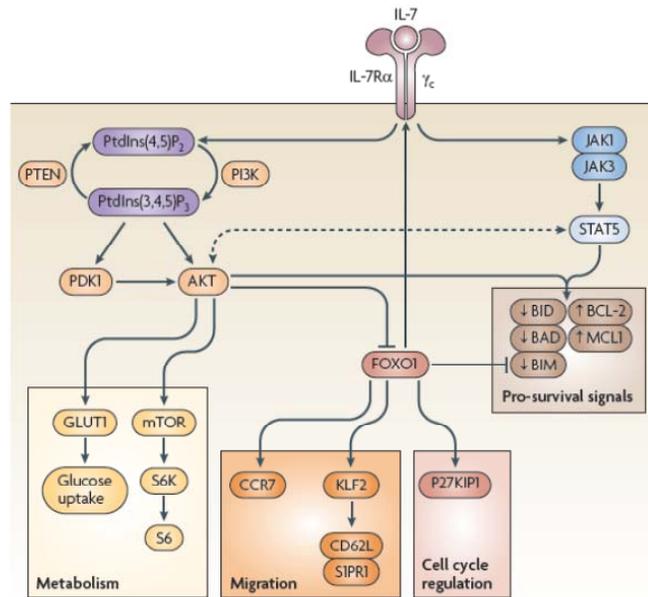


Figure 2 : Voie de signalisation de l'IL-7R. La voie de signalisation principale se fait par l'entremise de JAK1 et 3 et de STAT5 ou par PI3K. (Takada et Jameson, 2009).

La signalisation de l'IL-7 entraîne également la diminution de l'expression de l'IL-7Rα au niveau transcriptionnel. Il a été démontré que les Tn diminuaient l'expression du récepteur suite au contact avec l'IL-7 et réciproquement ré-exprimaient le récepteur en absence de la cytokine (Park et al., 2004). Ceci semble indiquer qu'il existerait une boucle de régulation négative permettant à un maximum de Tn de survivre avec une source aussi limitée et faible d'IL-7. D'ailleurs, l'expression continue d'un IL-7Rα transgénique sur les Tn entraîne une diminution du nombre de lymphocytes T, certainement en s'accaparant de tout l'IL-7 disponible.

1.4 Lymphopénie et prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs

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

Dans un contexte normal, la prolifération des lymphocytes T est très lente. Cependant, suite à une déplétion sévère du réservoir de lymphocytes, les lymphocytes T résiduels commencent à proliférer de façon beaucoup plus intense (Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). Ce phénomène, dans un contexte de lymphopénie, est appelé prolifération homéostatique (PH). La PH semble être dépendante des deux même signaux permettant la survie des Tn: l'interaction TCR-psCMH (Ernst et al., 1999) et la signalisation de l'IL-7 (Fry et Mackall, 2001).

Dans un contexte de lymphopénie, les concentrations élevées d'IL-7 seraient en partie responsables de la prolifération excessive des Tn et de l'acquisition d'un phénotype de type mémoire (CD44^{hi}) (Min et al., 2005; Hamilton et al., 2006). Il a été proposé que ce phénotype est dû à la réponse des Tn à des antigènes étrangers (microorganismes de la flore intestinale par exemple) comme lors d'une réponse immunitaire (Huang et al., 2005). Cependant ces lymphocytes T au phénotype mémoire sont aussi retrouvés dans un contexte où les souris lymphopéniques sont hébergées dans des conditions sans pathogènes (Vos et al., 1992). Certaines études démontrent maintenant que le changement phénotypiques seraient induit par la PH induite par les ligans psCMH (Ernst et al., 1999; Viret et al., 1999). Toutefois, il est important de noter que la majorité des travaux étudiant le phénotype mémoire lors de la PH a été entreprise sur les Tn CD8⁺. En règle générale, les Tn CD4⁺ sont beaucoup moins sensibles à la PH que les CD8⁺ et l'étude du phénotype mémoire semble plus complexe (Moon et al., 2007). D'ailleurs, peu de Tn CD4⁺ prolifèrent excessivement et la majorité conserve son phénotype naïf dans un contexte de PH (Min et al., 2005).

La propension des Tn à proliférer homéostatiquement dépend en partie de l'affinité de leur TCR pour le ligand psCMH (Kieper et al., 2004; Kassiotis et al., 2003). Des lymphocytes T CD8⁺ TCR transgéniques qui ont une forte affinité pour le psCMH (comme OT-I ou 2C) prolifèrent d'avantage quand ils sont transférées dans un hôte lymphopénique que ne le font des lymphocytes T de faible affinité (comme HY).

Une des caractéristiques intrigante de la PH est que les Tn CD8⁺ prolifèrent beaucoup plus rapidement que les Tn CD4⁺ dans un hôte lymphopénique (Guimond et al., 2009; Ernst et al., 1999). De même, la prolifération suite à l'injection d'IL-7 dans une souris normale est beaucoup plus importante pour les Tn CD8⁺ que CD4⁺ (Boyman et al., 2008). Cette différence n'est pas due à l'expression de l'IL-7R puisque les deux sous-types de cellules expriment des quantités relativement similaires. Une étude a démontré que la sensibilité des Tn CD8⁺ à l'IL-7 corrèle avec la présence accrue de radeaux lipidiques à la surface cellulaire (Cho et al., 2010). À cet égard, les Tn CD8⁺ expriment d'avantages de radeaux lipidiques que les Tn CD4⁺. Ces radeaux pourraient jouer un rôle dans le rassemblement des récepteurs des cytokines de la famille γ_c , ce qui pourrait expliquer la sensibilité accrue des lymphocytes T CD8⁺ à l'IL-7.

Comme mentionné plus haut, les Tn CD8⁺ sont beaucoup plus sensibles à l'IL-7 systémique que les Tn CD4⁺ et prolifèrent d'avantage dans un contexte de lymphopénie. Or, il a aussi été démontré que les niveaux élevés d'IL-7 entraînent une diminution de l'expression du CMH II sur les cellules dendritiques IL-7R α^+ (Figure 3). Une diminution de l'expression du CMH II pourrait donc également contribuer à expliquer les différences de prolifération observées entre les Tn CD4⁺ et CD8⁺. D'ailleurs, en empêchant la signalisation de l'IL-7 sur ces cellules dendritiques (IL-7R $\alpha^{-/-}$), l'expression du CMH II est restaurée et les Tn CD4⁺ peuvent proliférer.

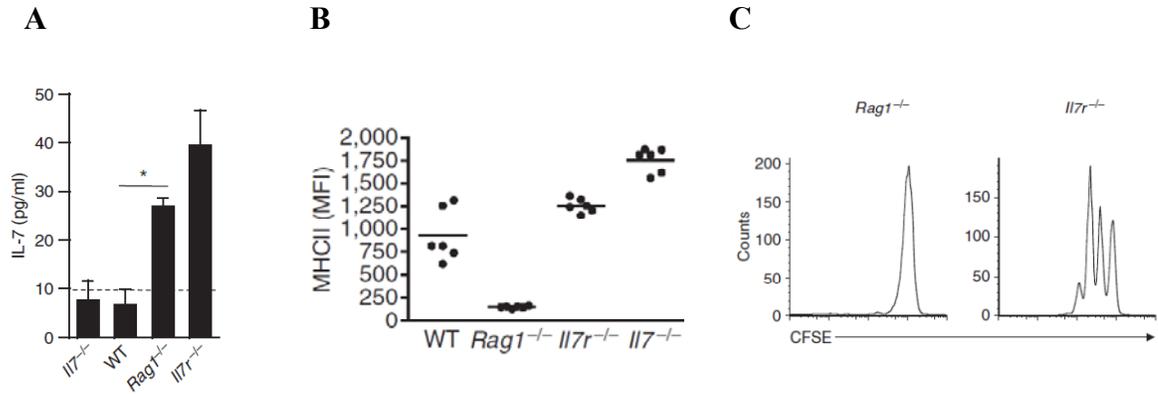


Figure 3 : Lien entre les niveaux élevés d'IL-7 systémiques et l'expression du CMH II sur les DC dans la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. A) Concentration d'IL-7 systémique en pg/ml dans des souris lymphopéniques (IL-7^{-/-}, Rag1^{-/-} et IL-7Rα^{-/-}) et sauvages (WT). B) Expression du CMH II sur les cellules dendritiques dans des souris lymphopéniques ou sauvages. C) Prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs 7 jours après transfert dans une souris Rag1^{-/-} ou IL-7Rα^{-/-} (Guimond et al., 2009)

1.4.2 Prolifération homéostatique par d'autres cytokines

La PH des Tn peut être déclenchée par d'autres cytokines de la famille γ c comme l'IL-2 ou l'IL-15 et ce même en absence de lymphopénie (Cho et al., 2007; Melchionda et al., 2005). Étrangement, il n'y a aucun effet sur la PH des Tn CD4⁺ et CD8⁺ dans des souris lymphopéniques génétiquement déficientes en IL-2 ou IL-15. Par contre, les Tn CD8⁺ polyclonaux ou transgéniques (OT-I), prolifèrent massivement lorsqu'on les transfère dans un hôte déficient soit pour l'IL-2Rα, IL-2Rβ ou l'IL2-RγC. Cette prolifération est presque équivalente à une réponse antigénique et ne s'applique qu'aux Tn CD8⁺ qui acquièrent un phénotype mémoire (CD44^{hi}CD62L^{hi} ou ^{lo}) (Cho et al., 2007; Ramsey et al., 2008).

Par ailleurs, les souris déficientes en IL-2R développent un syndrome lymphoprolifératif accompagné d'une inflammation systémique et de maladies auto-immunes (Willerford et al., 1995; Suzuki et al., 1995). Parallèlement, la surexpression de l'IL-15 cause aussi un syndrome lymphoprolifératif associé à une accumulation de cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Fehniger et al., 2001). Finalement, l'IL-2 ne semble pas être impliquée dans l'homéostasie des Tn tandis que l'IL-15 joue un rôle important dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK (Berard et al., 2003; Kennedy et al., 2000).

1.4.3 Prolifération homéostatique par des antigènes commensaux

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

1.5 Homéostasie des lymphocytes T mémoires

Il a été démontré que la survie prolongée et le renouvellement intermittent des lymphocytes T mémoires (Tm) ne nécessitent pas de contact avec le psCMH mais dépendent uniquement des cytokines IL-7 et IL-15. Nous décrivons brièvement les caractéristiques homéostatiques des Tm CD8⁺ et CD4⁺.

1.5.1 Homéostasie des lymphocytes T CD8⁺ mémoires

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

Étrangement, la génération des Tm CD8⁺ chez la souris IL-15^{-/-} est normale. Par contre, la survie de ces cellules est grandement diminuée (Becker et al., 2002). Dans un contexte de lymphopénie, les Tn CD8⁺ qui adoptent un phénotype mémoire lors de la PH développent une dépendance pour l'IL-15. De plus, l'IL-7 semble aussi jouer un rôle dans l'homéostasie des Tm CD8⁺ puisque cette cytokine serait suffisante pour leur survie (Schluns et al., 2000). En résumé, l'IL-15 est nécessaire pour l'homéostasie des lymphocytes Tm CD8⁺ alors que l'IL-7 est suffisante pour leur survie.

1.5.2 Homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ mémoires

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

2. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et maladie du greffon contre l'hôte

2.1 Les débuts de la greffe de moelle osseuse

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

Ce sont les modèles animaux qui permirent le développement de nos connaissances dans le domaine de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Des études chez la souris démontrèrent que l'injection de cellules de moelle osseuse par voie intraveineuse était la meilleure façon pour régénérer un système hématopoïétique (van Bekkum et al., 1967). On démontra également que l'injection de cellules de moelle osseuse allogénique (i.e. d'un hôte différent mais de la même espèce) pouvait rendre le receveur malade. Cette maladie fut décrite comme étant une réaction immunitaire des cellules lymphoïdes injectées contre les cellules de l'hôte et est maintenant connue sous le nom de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Billingham et Brent, 1957). Par la suite, des substances pouvant réduire les signes cliniques de la GVHD, comme le méthotrexate, commencèrent à être utilisées (Uphoff, 1958). Et c'est avec la découverte de l'importance du thymus dans la génération de nouvelles cellules lymphoïdes et de leur importance au niveau du système immunitaire (Good et al., 1962; Miller et Moreman, 1963) que débute la biologie de la transplantation.

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

2.2 La greffe de moelle osseuse pour traiter des cancers

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

La découverte des antigènes de transplantation a finalement permis de franchir la barrière allogénique (Dausset, 1958; Van Rood et al., 1958). L'importance des molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) dans la greffe de moelle osseuse allogénique fut démontrée à l'aide de modèles canins. Des chiens irradiés qui recevaient de la moelle de donneur incompatible pour les antigènes de transplantation (Dog Leucocyte Antigen, DLA) décédaient peu de temps après la greffe de GVHD (Figure 4). Par contre, ceux qui recevaient de la moelle osseuse d'un donneur DLA compatible avaient de meilleures chances de survie à long terme. Les chances de survie étaient encore augmentées si on traitait les receveurs au méthotrexate après la greffe de moelle osseuse pour diminuer la GVHD.

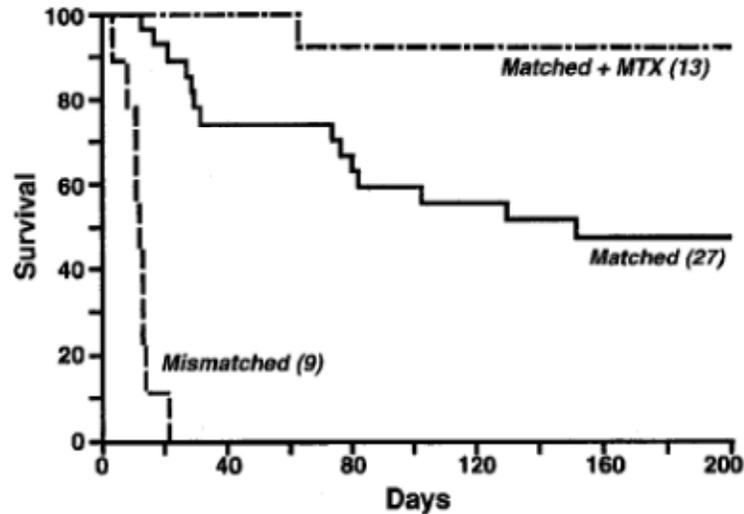


Figure 4: Courbe de survie après une greffe de moelle chez le chien. Survie de chiens ayant reçu une irradiation totale de 1000 rad et une greffe de moelle osseuse de donneur compatible (matched) ou non (mismatched) pour l'antigène leucocytaire du chien (DLA). Un groupe de receveur de moelle DLA-compatible a également reçu un traitement de méthotrexate après la greffe pour diminuer la GVHD (matched + MTX) (Thomas, 1999).

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

Le premier traitement contre la leucémie eut lieu chez un patient en phase blastique d'une leucémie myéloïde chronique. Il fût greffé avec succès avec de la moelle osseuse d'un donneur HLA compatible mais malheureusement décéda de complications associées à une infection par le cytomégalovirus (Buckner et al., 2001). Finalement, vers la fin des années 1970, on découvrit que des patients greffés au moment de leur première rémission, ou aux premiers signes de rechutes, voyaient leur chance de survie augmenter énormément (Thomas et al., 1979; Beutler et al., 1979).

Malgré des taux de mortalité assez élevés, les premiers résultats démontrèrent que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques permettait de guérir des patients atteints de différentes formes de cancer hématologiques.

2.3 Modèles animaux

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

1) Le régime de préparation chez l'humain comprend principalement un traitement de chimiothérapie combiné ou non à un traitement de radiothérapie. Ces traitements sont généralement administrés en doses multiples permettant ainsi de diminuer la toxicité et l'inflammation qui les accompagnent. Le régime de préparation chez la souris consiste quant à lui en un seul traitement de radiothérapie administré en une ou deux doses généralement beaucoup plus élevées. L'inflammation et les dommages tissulaires causés par le régime de préparation sont donc considérablement différents entre l'humain et la souris et vont influencer la sévérité de la GVHD.

2) Les différences génétiques et immunitaires entre le donneur et le receveur influencent la sévérité de la GVHD. Chez l'humain, le donneur et le receveur sont généralement associés selon leur compatibilité pour les antigènes majeurs du CMH et ne diffèrent qu'au niveau des antigènes mineurs d'histocompatibilité. Chez la souris, la plupart des modèles impliquent une incompatibilité majeure au niveau du CMH. De plus, il existe une multitude de lignées de souris qui ont chacune des ratios différents de cellules immunitaires pouvant aussi affecter la GVHD. Finalement, le fond génétique qui peut varier entre ces lignées va influencer la sévérité de la GVHD.

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

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

5) L'âge affecte la thymopoïèse ainsi que la sensibilité aux radiations (Ordemann et al., 2002). Alors que les greffes de cellules souches chez l'humain se font principalement à l'âge adulte, l'âge des souris auquel on étudie la GVHD est généralement de 8 à 12 semaines sur une durée de vie de 2 ans. De plus, le thymus de la souris est plus résistant à l'irradiation et pourra donc encore produire de nouveaux lymphocytes T.

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

2.4 Maladie du greffon contre l'hôte (GVHD)

En 1966, Billingham énonçait trois points pour que se développe une GVHD : 1) le greffon doit contenir des cellules immunologiquement compétentes, 2) le receveur doit exprimer des antigènes qui ne sont pas présents chez le donneur et 3) le receveur doit être incapable de réagir et d'éliminer les cellules immunocompétentes du greffon (Billingham, 1966). Nous savons désormais que ces cellules immunologiquement compétentes sont les lymphocytes T et qu'ils peuvent à eux seuls induire une GVHD dès qu'ils sont transférés dans un receveur qui ne peut pas les éliminer (Drobyski et Majewski, 1996; Kernan et al., 1986; Hervé et al., 1987; Sprent et al., 1986).

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

La prévalence de la GVHD aiguë dépend en grande partie du degré de compatibilité entre le donneur et le receveur. La prévalence peut varier de 35-45% chez les receveurs d'une greffe complètement compatible (d'un frère ou d'une sœur donneur) à 60-80% suite à une greffe de donneur non-apparenté incompatible au niveau d'un antigène HLA (Loiseau et al., 2007; Shaw et al., 2010; Flomenberg et al., 2004). Les régions les plus touchées par la GVHD aiguë sont la peau (81% des patients), le tube gastro-intestinal (54% des patients) et le foie (50% des patients) (Martin et al., 1990). Les poumons, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires peuvent aussi être affectés. La GVHD aiguë peut être divisée en quatre stades, dépendamment de l'atteinte des organes cibles et de la gravité des dommages. Le stade 1 représente une maladie de faible intensité, avec une atteinte cutanée sur environ 25% de la peau. Au stade 2, la sévérité de la GVHD est considérée comme moyenne, 50% de la peau est affectée, le foie peut commencer à être touché et le patient peut avoir une faible diarrhée et des nausées. Au stade 3 la GVHD est plus sévère, plus de 50% de la peau est affectée, le foie est atteint et le patient a des crampes au ventre et de la diarrhée. Finalement, le stade 4 est considéré comme très sévère, la peau peut avoir des

cloques et le patient devient ictérique. Les stades 3 et 4 ont un mauvais pronostic, la survie à long terme au stade 3 n'est que de 25% tandis qu'elle n'est que de 5% au stade 4 (Cahn et al., 2005).

2.4.1 Pathophysiologie de la GVHD aiguë

Dû aux connaissances réduites que nous avons sur la GVHD chronique, nous nous concentrerons sur la GVHD aiguë durant cette revue de la littérature. Nous nous référerons donc à partir de maintenant à la GVHD aiguë lorsque l'on écrira GVHD.

La progression de la GVHD peut être divisée en trois étapes principales: 1) le dommage tissulaire causé par le régime de préparation, 2) l'activation des lymphocytes T du donneur et 3) les dommages infligés aux tissus cibles par les lymphocytes T du donneur (Figure 5).

La réponse immunitaire est déclenchée par les dommages causés par le régime de préparation (Figure 5). Les tissus endommagés libèrent des cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine 1 (IL-1) ou le TNF- α (tumor necrosis factor alpha) et des chimiokines qui vont entraîner l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (APC) et l'augmentation de l'expression de molécule d'adhésion, de costimulation ainsi que des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Xun et al., 1994; Antin, 2001). Les dommages au niveau du tube gastro-intestinal vont également libérer des produits microbiens comme le lipopolysaccharide (LPS) et autres molécules associées aux pathogènes (PAMPs) qui vont accentuer l'activation des cellules dendritiques (DC) par signalisation via les récepteur Toll (TLR) (Hill et Ferrara, 2000; Hill et al., 1997; Cooke et al., 2001).

La deuxième étape, l'activation des lymphocytes T du donneur, débute avec l'identification par le TCR des antigènes mineurs d'histocompatibilité de l'hôte présentés par les APC de l'hôte (Chakraverty et Sykes, 2007) (Figure 5). Cette activation est accentuée par l'expression accrue des molécules de costimulation sur les APC. Les lymphocytes T activés se mettent alors à proliférer et à acquérir leur fonction effectrice. Ils vont sécréter des cytokines comme l'IFN γ qui entraînent l'activation d'autres cellules effectrices comme les

neutrophiles, les monocytes, les cellules NK et les macrophages, ces derniers pouvant sécréter de l'IL-1, du TNF- α et de l'oxide nitrique.

La troisième étape est définie comme étant la destruction des tissus cibles par des médiateurs cellulaires (lymphocytes T cytotoxiques, cellules NK) et solubles (cytokines proinflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 ou l'interféron γ) (Figure 5). Ces dommages amplifient la relâche de cytokines proinflammatoires qui va contribuer à accentuer la GVHD.

2.4.1.1 APC et présentation antigénique

La présentation antigénique est au cœur de la réponse immunitaire. Les travaux effectués chez la souris ont démontré que les lymphocytes T CD8⁺ du donneur doivent être activés par les APC de l'hôte afin de déclencher la GVHD (Chakraverty et Sykes, 2007; Shlomchik et al., 1999; Matte et al., 2004). Une fois la GVHD initiée, les APC du donneur suffisent pour maintenir la GVHD (Matte et al., 2004). Chez l'humain, l'apparition de la GVHD est directement reliée au niveau de compatibilité des antigènes majeurs d'histocompatibilité. Cependant, des receveurs d'une greffe HLA-identique peuvent quand même développer une GVHD dû à des différences génétiques situées en dehors des loci du CMH et qui codent pour des protéines appelées antigènes mineurs d'histocompatibilité (miHA) (Korngold et Sprent, 1983). Ces miHA qui sont présentés par le CMH proviennent de protéines dont le polymorphisme varie entre individus. Il n'existe pour l'instant aucun instrument pour mesurer cette incompatibilité, ce qui rend la GVHD difficile à prédire dans ce contexte.

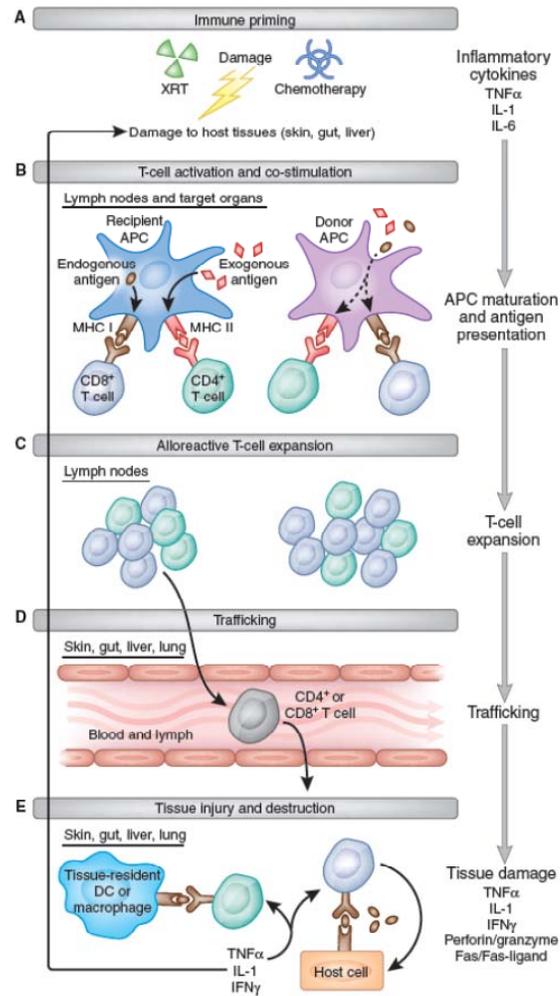


Figure 5 : Étapes de la GVHD aiguë chez la souris. La progression de la GVHD peut-être divisée en trois étapes principales, A) Les dommages tissulaires induits par la radiothérapie et libération de cytokines pro-inflammatoires B-D) activation, prolifération et migration des lymphocytes T alloreactifs et E) destruction des tissus cibles.(Schroeder et DiPersio, 2011)

2.4.1.2 Sous-type de lymphocytes T impliqués

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ sont les acteurs principaux de la GVHD. La déplétion des lymphocytes T diminue radicalement l'incidence de la GVHD chez la souris, le chien et l'humain (Yu et al., 2006; Truitt et Atasoylu, 1991). Suite à une greffe de moelle osseuse CMH-incompatible, les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ peuvent induire une GVHD. Dans le cas d'une greffe CMH-compatible mais miHA-incompatible, les lymphocytes T CD8⁺ semblent jouer un rôle plus important dans la GVHD alors que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent dans certains cas supporter l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et participer à l'induction de la GVHD (Yu et al., 2006).

Plusieurs populations de lymphocytes T sont impliquées dans la GVHD. Chez la souris, il a été démontré que les Tn CD8⁺ peuvent induire une GVHD (Anderson et al., 2003). À l'inverse les Tm sont incapables d'induire une GVHD. Une des hypothèses pour expliquer que les Tm ne peuvent pas induire une GVHD est qu'ils n'expriment pas le CD62L ou le CCR7 qui sont nécessaires à la migration des Tn vers les ganglions lymphatiques ou les plaques de Payer pour s'activer. Cependant, des Tn qui n'expriment pas le CD62L et le CCR7 peuvent quand même déclencher une GVHD, supposément en s'activant dans le foie ou la moelle osseuse (Anderson et al., 2008). Ces résultats ne sont pas surprenants si l'on considère que le système immunitaire du donneur n'a possiblement jamais été exposé aux antigènes d'histocompatibilité du receveur. Dans ce contexte, le réservoir de lymphocytes T mémoires d'un donneur serait constitué d'un répertoire de lymphocytes T capable de réagir contre une panoplie d'antigènes viraux, bactériens ou autres, mais certainement pas contre les antigènes de transplantation du receveur à moins qu'il n'y ait réaction croisée.

2.4.1.3 Importance de la costimulation

Les molécules de costimulation jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et le déclenchement de la GVHD. L'absence de costimulation entraîne généralement l'anergie des lymphocytes T. Dans un contexte de GVHD, l'inflammation active les APC qui, suite à ce stimulus, augmentent l'expression des molécules de costimulation. L'interaction entre le récepteur CD28 exprimé sur les lymphocytes T et ses

ligands CD80 et CD86 exprimés sur les APC permet l'activation des lymphocytes T. D'ailleurs, l'inhibition de cette interaction par des molécules antagonistes des ligands B7 ou par des Ig-CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), permet de réduire considérablement l'intensité de la GVHD (Yu et al., 2000; Hakim et al., 1995; Blazar et al., 1994). La molécule ICOS (Inducible Costimulator), une autre molécule de costimulation, interagit avec le ligand B7H exprimé à la surface des APC et stimule la réponse effectrice. L'inhibition de l'interaction d'ICOS avec B7h diminue aussi la sévérité de la GVHD (Taylor et al., 2005; Li et al., 2011). La molécule PD-1 (Program death-1) est un frein naturel des lymphocytes T activés (comme CTLA-4) et son absence est associée à une production accrue d'interféron gamma (IFN γ) ainsi qu'à une sévérité plus importante de la GVHD. La famille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor receptor) joue aussi un rôle important dans la GVHD et l'inhibition du TNF α par l'utilisation d'anticorps monoclonaux démontre une certaine efficacité pour diminuer les signes cliniques de la GVHD. La molécule OX40 exprimée sur les lymphocytes T activés semble aussi contribuer à la GVHD lorsque celle-ci se lie avec son ligand OX40L exprimé sur les APC (Tsukada et al., 2000; Blazar et al., 2003). CD40L, qui n'est exprimé que sur les lymphocytes T CD4⁺ activés, contribuerait aussi à la sévérité de la GVHD (Blazar et al., 1997; Buhmann et al., 1999). Finalement, 4-1BB présente un potentiel intéressant pour contrôler la GVHD puisque son inhibition réduit considérablement la sévérité de la GVHD causée par les lymphocytes T CD8⁺ (Wang et al., 2009; Blazar et al., 2001a; Nozawa et al., 2001).

2.4.1.4 Migration des lymphocytes T

Suite à la greffe de moelle osseuse allogénique, les lymphocytes T du donneur contenus dans le greffon vont migrer vers les organes lymphoïdes où ils vont recevoir des signaux d'activation de la part des APC du receveur (Negrin et Contag, 2006). Une fois activés, ces lymphocytes vont migrer vers les tissus cibles et causer la pathologie propre à la GVHD. Presque tous les tissus expriment des antigènes qui peuvent être reconnus par les lymphocytes T alloréactifs. Pourtant, la GVHD est limitée à des organes bien précis, le tube digestif, la peau, le foie, les poumons et les organes lymphoïdes secondaires (Socié et Blazar, 2009; Ferrara et al., 2009; Shlomchik, 2007). Ceci suppose que les lymphocytes T migrent vers ces sites grâce à une combinaison de signaux et de récepteurs bien spécifiques.

Il faut aussi mentionner que ces organes renferment un nombre impressionnant d'APC, ce qui pourrait expliquer en partie la prédisposition de ces organes à la GVHD. Le récepteur CCR7 est exprimé entre autres par les lymphocytes T naïfs et les APC. Ce récepteur a deux ligands naturels, CCL21 et CCL19, qui permettent aux cellules de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

Vu l'importance des organes lymphoïdes secondaires dans l'activation des lymphocytes T alloréactifs, des chercheurs ont mis au point une molécule, le fingolimod (FTY720), qui empêche les lymphocytes T de sortir des organes lymphoïdes. Chez la souris et le rat, l'utilisation du FTY720 diminue considérablement le développement de la GVHD (Hashimoto et al., 2007; Song et al., 2006). Cependant, l'administration du même composé chez le chien ne semble pas avoir d'effets bénéfiques (Lee et al., 2003). Des essais cliniques chez l'humain sont présentement en cours.

2.4.1.5 Fonctions effectrices des lymphocytes T

Une fois rendus aux organes cibles, les lymphocytes T activés peuvent relâcher des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ . Cette action ne nécessite pas de contact direct entre les lymphocytes T et les tissus cibles (Teshima et al., 2002a). Dans des greffes de moelle osseuse MHC-incompatible, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent induire une GVHD sans contact direct car la maladie serait en partie causée par la sécrétion de cytokines telles l'IFN γ , le TNF α et l'IL-1. D'ailleurs, l'IFN γ active les neutrophiles, cellules NK, monocytes et APCs et augmente la présentation des antigènes du soi par les cellules non immunitaires de l'hôte, ce qui contribue à accentuer la GVHD.

Les lymphocytes T CD8⁺ requièrent généralement une interaction avec l'antigène pour relâcher des perforines, granzymes et exprimer Fas ligand (FasL). Cependant, des lymphocytes T déficients en FasL et perforine peuvent encore induire une GVHD ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes qui contribuent à la GVHD (Marks et al., 2004). On peut penser par exemple à des cytokines comme le TNF α ou l'IFN γ , ou sinon à d'autres ligands induisant l'apoptose comme ceux faisant partie de la famille des TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand).

2.4.2 Pathophysiologie de la GVHD chronique

La pathophysiologie de la GVHD chronique est moins bien comprise que celle de la GVHD aiguë, en partie à cause du nombre limité de modèles animaux pour l'étudier. La GVHD chronique ressemble d'avantage à une maladie auto-immune. Les modèles de développement de la maladie impliquent trois mécanismes pathologiques principaux : la production d'auto-anticorps, des voies de signalisation pro-fibrotiques et une fonction thymique défectueuse. Comparé à la GVHD aiguë, la réponse immunitaire déclenchée dans la GVHD chronique n'est pas causée par des dommages tissulaires (Figure 6). D'ailleurs, l'inflammation est généralement diminuée dans la GVHD chronique. Les dommages thymiques lors de la GVHD aiguë pourraient être responsables d'une sélection négative déficiente, ce qui pourrait permettre la génération de lymphocytes T autoréactifs (Zhang et al., 2007). À ce stade, l'activation des lymphocytes T ne dépend plus des APC du receveur mais bien des APC produits à partir des cellules souches hématopoïétiques du donneur qui présentent des antigènes du receveur.

La présence des lymphocytes T CD4⁺ semble être nécessaire et suffisante pour induire la GVHD chronique (Zhang et al., 2006). Les lymphocytes T CD4⁺ serviraient à soutenir la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B via la sécrétion de cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Les lymphocytes T et B une fois activés peuvent migrer vers les organes cibles et induire de la fibrose et une inflammation chronique. Finalement, en plus des organes cibles de la GVHD aiguë, la GVHD chronique va s'attaquer aux muqueuses et aux glandes.

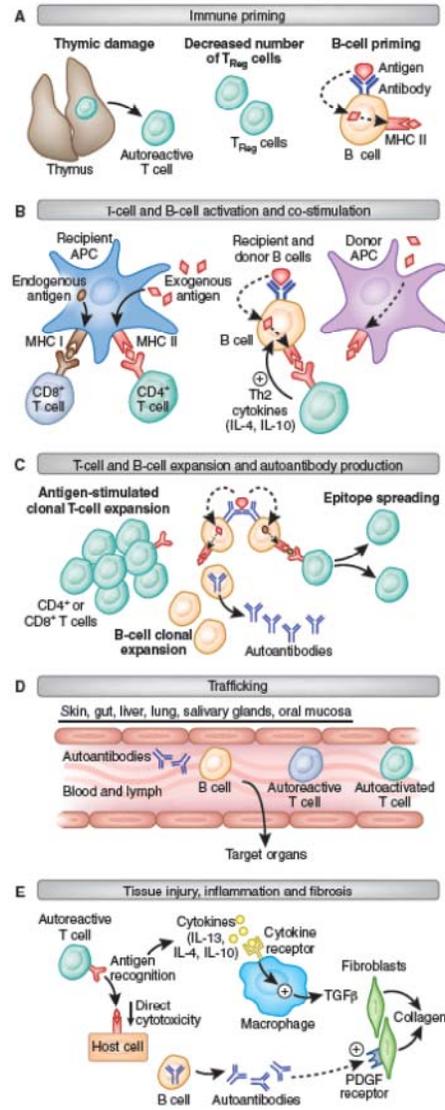


Figure 6 : Étapes de la GVHD chronique chez la souris. La progression de la GVHD chronique peut-être divisée en cinq étapes principales, A) l'activation des lymphocytes T et B, B-D) activation, prolifération et migration des lymphocytes T et B et E) destruction des tissus cibles par inflammation chronique et fibrose.(Schroeder et DiPersio, 2011)

2.5 GVL et contrôle de la GVHD

2.5.1 La réaction du greffon contre la leucémie (GVL)

L'histoincompatibilité à la base de la GVHD est également responsable d'un effet bénéfique appelé réaction du greffon contre la leucémie (GVL) où les cellules cancéreuses résiduelles, i.e. les cellules qui ont échappé à la chimiothérapie, sont reconnues et détruites par les lymphocytes T alloréactifs et les cellules NK du donneur (Kolb et al., 1995). En effet, dès les débuts de la greffe de moelle osseuse allogénique, il a été observé que des patients greffés avec de la moelle osseuse non-compatible avaient moins de chance de rechutes leucémiques que des patients greffés avec de la moelle osseuse d'un donneur compatible (Weiden et al., 1979). On sait maintenant que les lymphocytes T alloréactifs ont la capacité d'éliminer les cellules leucémiques. Ainsi, les probabilités de rechute leucémique suite à une greffe de moelle osseuse syngénique (jumeaux identiques) ou une greffe de moelle osseuse sans lymphocytes T sont d'environ 50-60% cinq ans après la greffe (Horowitz et al., 1990) (Figure 7). À l'inverse, les patients greffés avec de la moelle osseuse allogénique ont environ 30% de chances de faire des rechutes s'ils n'ont pas de GVHD et environ 20% s'ils en sont atteints. Les probabilités de rechutes diminuent encore si les patients sont atteints de GVHD chronique seule ou en combinaison avec une GVHD modérée.

Malheureusement, la GVHD entraîne elle-même des complications. Le défi est présentement de séparer la réaction GVL de la réaction GVHD. Une des techniques expérimentales consiste à isoler des lymphocytes T du donneur qui possèdent une activité anti-leucémique pour les infuser au patient (Kolb et al., 1995; Collins et al., 1997). Malheureusement ce type d'approche demeure expérimental et plusieurs améliorations restent à faire.

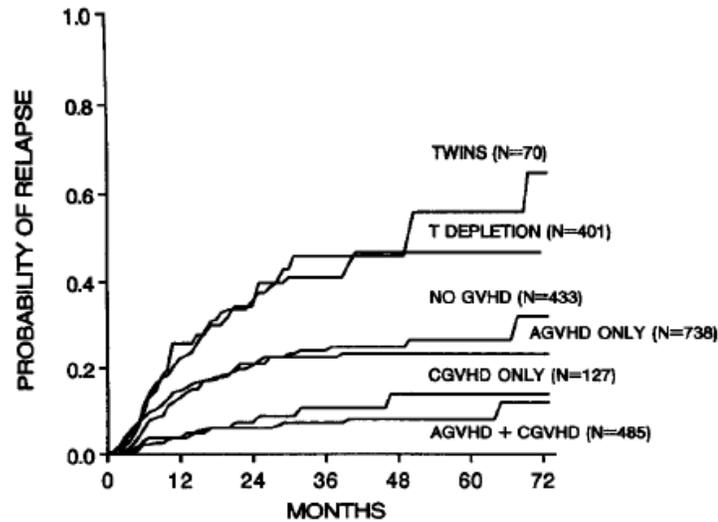


Figure 7 : Probabilité de rechute leucémique après une greffe de moelle osseuse allogénique dépendamment du type de greffe et de GVHD. (Horowitz et al., 1990)

2.5.2 Prophylaxie de la GVHD

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

Les lymphocytes T sont les acteurs principaux de la GVHD. Différentes stratégies de prophylaxie visent à éliminer ou à bloquer l'action de ces cellules. Il existe trois techniques principales d'élimination des lymphocytes T : 1) une déplétion des lymphocytes T *ex vivo* (purging), 2) la sélection positive des cellules souches CD34⁺ *ex vivo* et 3) des anticorps contre les lymphocytes T *in vivo* (Ferrara et al., 2009). Toutes ces techniques permettent une diminution importante de la GVHD mais entraînent une augmentation du rejet de greffe, de rechutes leucémiques et des infections. En effet, certaines études ont démontré que la déplétion des lymphocytes T était associée à des chances de survie plus faible qu'une immunosuppression standard chez des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse

allogénique (Champlin et al., 2000). Par contre, l'immunosuppression standard n'est pas efficace contre toutes les GVHD, ce qui explique l'apparition de GVHD de stade 3 ou 4.

La meilleure technique d'élimination des lymphocytes T *in vivo* est l'utilisation de globulines anti-lymphocyte. Ces globulines sont isolées à partir du sérum de cheval ou de lapin et qui contient des titres élevés d'anticorps polyclonaux dirigés contre les lymphocytes T du donneur. Cependant les effets biologiques varient considérablement entre individus et les effets négatifs inclus de la fièvre, des maux de tête, de la thrombocytopénie (réaction croisée avec les plaquettes) et quelquefois un choc anaphylactique (Bacigalupo, 2005).

Plusieurs techniques pharmacologiques visent à bloquer l'action des lymphocytes T en inhibant leur activation. La cyclosporine est un inhibiteur de la calcineurine, une enzyme cytoplasmique nécessaire à l'activation des lymphocytes T, et est souvent administrée aux patients en GVHD. Elle peut être remplacée par d'autres immunosuppresseurs tel que le tacrolimus, le methotrexate, le mycophenolate mofetil (qui semble avoir une plus faible toxicité que le methotrexate) ou la rapamycine (Bolwell et al., 2004)).

2.5.3 Traitement de la GVHD

La GVHD apparaît généralement dans les mois qui suivent la greffe. Le traitement standard est l'utilisation de corticostéroïdes qui diminuent l'inflammation et la prolifération des lymphocytes T. Cependant, l'utilisation de corticostéroïdes entraîne une diminution des signes cliniques de la GVHD chez moins de 50% des patients et les GVHD sévères ont moins de chance de répondre au traitement (MacMillan et al., 2002).

L'injection de cellules stromales mésenchymateuses, même si le mécanisme d'action n'est pas connu, semble donner de bons résultats avec 55% de réponse dans une étude de phase II chez des patients avec une GVHD résistante aux corticostéroïdes (Le Blanc et al., 2008).

L'utilisation d'un inhibiteur de cytokines semble aussi avoir un effet bénéfique. Dans une étude clinique de phase II, 70% des patients ont vu leurs symptômes de GVHD disparaître après traitement avec l'etanercept, un récepteur soluble du TNF α , en combinaison avec des stéroïdes (Levine et al., 2008).

Un traitement de plus en plus répandu pour faire face à la GVHD est la photophérèse extracorporelle. Ce traitement consiste à prélever les lymphocytes du patient en GVHD par leucophérèse et de les marquer avec un agent intercalant l'ADN, le 8-méthoxypsoralen, qui sous l'action des rayons UVA deviendra cytotoxique. Dans une étude de phase II portant sur la photophérèse corporelle dans les cas de GVHD résistante aux stéroïdes, 50% des patients ont vu leur maladie régresser et on atteint une survie à long terme (Greinix et al., 2006)

Le 4,5-dibromorhodamine-123, communément appelé TH9402, est utilisé avant la greffe de moelle osseuse pour éliminer spécifiquement les lymphocytes T qui causent la GVHD. Suite à une activation *in vitro* des cellules du donneur contre les cellules du receveur, le TH9402 est préférentiellement retenu à l'intérieur des lymphocytes T activés. Lorsque les cellules sont exposées à la lumière, les lymphocytes T activés sont éliminés (Guimond et al., 2002).

2.6 Transplantation de cellules souches hématopoïétiques et reconstitution immunitaire

2.6.1 Reconstitution des lymphocytes T

Malgré les succès de la greffe de moelle osseuse allogénique, la reconstitution défaillante du système immunitaire des patients demeure encore un obstacle à leur survie (Figure 8). Plusieurs facteurs sont responsables de cette immunosuppression. Le régime de préparation avant la greffe suivi du traitement d'immunosuppression pour maîtriser la GVHD rendent les patients extrêmement immunosupprimés. Le nombre restreint de lymphocytes T injectés avec le greffon ne permet pas une reconstitution optimale du réservoir de lymphocytes T et la GVHD elle-même entraîne une diminution substantielle de la reconstitution immunitaire des lymphocytes T.

L'absence de lymphocytes T est associée à une susceptibilité accrue aux infections opportunistes ainsi qu'à de moins bonnes réponses aux vaccins. D'ailleurs, les infections sont responsables d'environ 10% de la mortalité suite à une greffe de moelle osseuse HLA-compatible apparentée et 29% de la mortalité suite à une greffe de moelle osseuse HLA-

compatible non-apparentée (Uzunel et al., 2006). Les principaux responsables de cette mortalité sont le cytomégalovirus, le virus Epstein Barr et les infections fongiques, surtout les espèces du groupe *Candida* et *Aspergillus*.

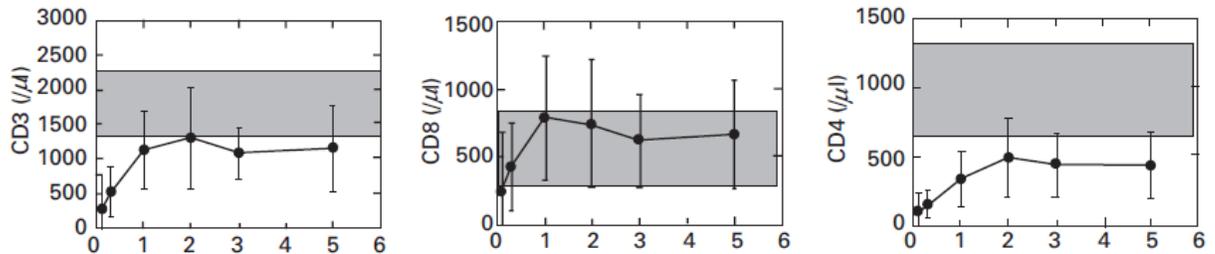


Figure 8: Nombre de lymphocytes T par microlitre de sang chez des patients ayant reçu une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Ordonnées : nombre de cellules / μ l de sang; abscisse : années post-transplantation; rectangle gris : moyenne normale (Fujimaki et al., 2001)

Il existe deux façons de régénérer des lymphocytes T chez un patient greffés : 1) la prolifération homéostatique des lymphocytes T matures contenus dans le greffon et 2) la production *de novo* de lymphocytes T naïfs dérivés de la moelle du donneur et produit par le thymus du patient. La production *de novo* de lymphocytes T permettrait de générer des lymphocytes T dérivés du donneur tolérants envers le greffon et l'hôte et détenant un répertoire TCR étendu. Malheureusement, la fonction thymique décroît relativement tôt chez l'humain et la production de nouveaux lymphocytes T à partir du thymus est très faible chez l'adulte (Lynch et al., 2009). De plus, le régime de préparation ainsi que la GVHD endommagent le thymus et empêchent le développement de nouveaux lymphocytes T (Krenger et al., 2011). Dans ce contexte, la PH des lymphocytes T du greffon demeure l'unique moyen pour permettre la reconstitution des lymphocytes T.

L'administration de KGF (keratinocyte growth factor) avant la greffe pourrait protéger le thymus contre les dommages induits par la chimiothérapie et ainsi permettre une meilleure reconstitution immunitaire thymique (Panoskaltsis-Mortari et al., 2000; Min et al., 2002). L'administration d'interleukin-7 (IL-7) pourrait aussi être intéressante puisque l'IL-7 agit sur la survie des lymphocytes T naïfs. Malheureusement, différentes études se contredisent

quant à son action bénéfique dans un contexte de GVHD (Alpdogan et al., 2001; Chung et al., 2008; Sinha et al., 2002). Dans le même ordre d'idée, l'injection d'IL-15 et de Fms-related tyrosine kinase-3 ligand (FL) pourrait améliorer la reconstitution des lymphocytes T post-greffe (Alpdogan et al., 2005; Blazar et al., 2001b; Fry et al., 2004). Cependant, comme pour l'IL-7, ces cytokines dans certaines conditions semblent accroître la GVHD plutôt que de la diminuer (Blaser et al., 2005; Blazar et al., 2001b).

2.6.2 Reconstitution des lymphocytes T CD4⁺

De toutes les cellules immunitaires, ce sont les lymphocytes T CD4⁺ qui sont le plus affectés lors de la reconstitution immunitaire post-greffe (Storek et al., 2008; Klyuchnikov et al., 2010; Fujimaki et al., 2001). Comparé aux lymphocytes T CD4⁺, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ semble se restaurer dans les mois qui suivent la greffe de moelle osseuse (Figure 8). Les raisons de l'absence de reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ naïfs demeurent encore peu comprises. Une des questions clés est de savoir si cette absence de reconstitution est due à un défaut intrinsèque des lymphocytes T CD4⁺ ou à l'environnement de la GVHD qui empêche leur expansion. Dulude et ses collègues ont démontré que les lymphocytes T non-alloréactifs n'ont pas la capacité de proliférer dans un hôte en GVHD (Dulude et al., 1999). À l'inverse, des lymphocytes T isolés d'un hôte en GVHD sont capables de proliférer dans un second hôte lymphopénique qui n'est pas en GVHD. De plus, ces lymphocytes T sont capables de diversité moléculaire dans ce nouvel hôte (Gorski et al., 2007). Ces résultats portent donc à croire qu'un défaut de l'environnement serait responsable de la perte quantitative et qualitative de la reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ dans un hôte en GVHD. D'ailleurs, Delisle et ses collègues ont démontré récemment que l'absence d'expansion des lymphocytes T était due à une diminution de la prolifération et une apoptose induite par FasL et l'IFN γ (Brochu et al., 1999; Delisle et al., 2008).

L'IL-7 et l'interaction TCR-psCMH sont considérés comme jouant un rôle clé dans l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ (Jameson, 2002). L'hypothèse émise a d'ailleurs été que l'absence de reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ dans un hôte en GVHD était due à une diminution des niveaux d'IL-7 systémiques. Toutefois, des études ont plutôt

démontré que les niveaux d'IL-7 étaient anormalement élevés chez les individus en GVHD et que la reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺ n'était pas nécessairement améliorée par l'administration d'IL-7 (Sinha et al., 2002; Chung et al., 2008; Dean et al., 2008).

Notre laboratoire a démontré récemment que les niveaux élevés d'IL-7 pouvait avoir un effet paradoxal sur la reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺ et cela en diminuant la capacité des DC à supporter la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Guimond et al., 2009). Compte tenu du rôle critique de la stimulation des TCR par les psCMH, il est possible que l'absence de reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺ soit en partie due à une dérégulation de l'homéostasie des DC comme telles.

3. Hypothèse et objectifs

3.1 Hypothèse

La réaction du greffon contre l'hôte demeure la cause principale de mortalité suite à une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. La GVHD entraîne une diminution de la reconstitution immunitaire, surtout des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, ce qui accentue considérablement l'immunosuppression associée à ce traitement et de ce fait augmente les risques d'infection et de rechute.

Il a été démontré que les niveaux d'IL-7 systémiques dans des hôtes lymphopéniques sont beaucoup plus élevés que dans des hôtes normaux (Dean et al., 2008; Guimond et al., 2009). Ces niveaux élevés d'IL-7 diminuent l'efficacité de la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en altérant l'expression du CMH II sur les cellules dendritiques. En bloquant la signalisation de l'IL-7 sur les cellules dendritiques (IL-7R $\alpha^{-/-}$), l'expression du CMH II est restauré et les cellules dendritiques peuvent à nouveau supporter la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

Nous avons émis l'hypothèse que la signalisation de l'IL-7 sur les cellules dendritiques contribuerait à diminuer la reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans un contexte de GVHD et que l'utilisation d'une niche permissive à la prolifération homéostatique (IL-7R $\alpha^{-/-}$) permettrait de rétablir les nombres de lymphocytes T CD4⁺.

3.2 Objectifs

- 1) Évaluer la sévérité de la GVHD entre des souris lymphopéniques dont la niche périphérique soutient ou non la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.
- 2) Étudier la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs chez un hôte dont la niche périphérique est permissive à la prolifération homéostatique dans un contexte de GVHD.
- 3) Étudier la niche périphérique responsable de la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs chez un hôte en GVHD.

Matériels et méthodes

4.1 Souris

Toutes les expériences ont été approuvées par le Comité de Protection des Animaux du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les souris femelles C57BL/6.SJL (B6.SJL;H-2^b, Ptprc^a Pep3^b, CD45.1⁺), C57BL/6.129S7-Rag1^{tmMom/J} (Rag^{-/-}; H-2^b, CD45.2⁺) et (C57BL/6 X DBA2/J) F₁ (B6D2F₁; H-2^{b/d}, CD45.2⁺) proviennent de la compagnie The Jackson Laboratory. Les souris C57BL/6.129S7-IL-7r^{tm1lmx/J} (IL-7Rα^{-/-}; H-2^b, CD45.2⁺) et Marilyn ont été fournies par Crystal L. Mackall du National Institutes of Health. Les souris IL-7Rα^{-/-} CD45.1 ont été hébergées à l'animalerie du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont.

4.2 Greffe de moelle osseuse et GVHD

Toutes les greffes de moelle osseuse ont été effectuées avec des souris femelles de 8 à 12 semaines. Afin de générer des souris chimères, la moelle osseuse des souris donneuses a été extraite à partir des tibias et fémurs. Les souris receveuses ont été irradiées à 1000 rad avec un accélérateur linéaire 6MV (Elekta) et ont été injectées par voie intraveineuse avec 10x10⁶ cellules de moelle osseuse. Les souris chimères ont été utilisées 8 semaines après la greffe. Pour induire une GVHD, les souris receveuses irradiées ont reçu par voie intraveineuse 10x10⁶ cellules de moelle osseuse combinées à 1x10⁶ de lymphocytes T allogénique au receveur. Le poids et la condition générale des souris receveuses (posture, déplacements, peau et réflexes) ont été évalué à tous les 2-3 jours.

4.3 Cytométrie en flux

Les splénocytes ont été resuspendus à une densité de 10x10⁶ de cellules par millilitre dans du PBS (Phosphate buffer saline : NaCl 0,137M, Na₂HPO₄ 8,1x10⁻³M, KCL 2,7x10⁻³M, KH₂PO₄ 1,5x10⁻³M) et ont été incubés pendant 30 min sur glace avec des anticorps monoclonaux dilués. Les cellules ont été par la suite lavées deux fois avec du PBS. Les anticorps suivants ont été utilisés : de la compagnie BD Pharmingen, phycoerythrin (PE)-Vβ6 (RR4-7); PE-CD4 (RM4.5); allophycocyanin (APC)-CD4

(RM4.5); de la compagnie BioLegend, peridinine chlorophyll protein complex-cyanine 5.5 (PerCPCy5.5)-CD4 (GK1.5); PerCPCy5.5-CD45.1 (A20); fluorescein isothiocyanate (FITC)-CD8 (5H10-1); PE-CD11c (N418); APC-CD11b (M1/70); PerCPCy5.5-CD11b (M1/70); FITC-B220 (RA3-6B2); PE-TCR β (H57-597); APC-CD44 (IM7) et PE-CD62L (MEL-14). APC-CD45.1 (A20) provient de la compagnie eBioscience et APC-mPDCA-1 (JF05-1C2.4.1) provient de la compagnie Miltenyi Biotec.

L'immunofluorescence a été déterminée par FACSCalibur à deux lasers (Becton Dickinson) en analysant au moins 2×10^4 cellules pour la pureté et jusqu'à 10×10^6 cellules pour l'analyse de prolifération. Le logiciel FlowJo (TreeStar) a été utilisé pour les analyses.

4.4 Marquage au CFSE et transfert adoptif des lymphocytes T

Les rates des souris Marylin ont été homogénéisées et les lymphocytes T isolés par sélection négative avec le kit d'enrichissement des cellules T murines (Mouse T cell enrichment kit, StemCell Technology). Les lymphocytes T enrichis ont été par la suite suspendus dans du PBS à une densité de 10×10^6 /ml puis marqués pendant 15 min à 37°C avec 1 μ l de CFSE à 5 μ M (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl diester, Invitrogen). Les lymphocytes T ont été lavés deux fois avec du PBS puis resuspendus à 2×10^6 /ml dans du PBS. Les souris ont reçu 1×10^6 lymphocytes T marqués au CFSE par voie intraveineuse. Après 7 jours, les souris ont été sacrifiées et la prolifération des lymphocytes T a été analysée avec par cytométrie (FACSCalibur, BD). Le logiciel FlowJo (TreeStar) a été utilisé pour les analyses. Le calcul des nombres absolus de cellules récupérées a été effectué en sélectionnant les lymphocytes T exprimant les marqueurs TCR V β 6 et CD4.

4.5 Cytotoxicité in vivo

Les rates des souris ont été homogénéisées et les DC isolées par sélection positive avec le kit de sélection positive des cellules CD11c⁺ murine (Mouse CD11c positive selection kit, StemCell Technology). Les DC enrichies ont été resuspendues à 10×10^6 /ml puis marquées pendant 15 min à 37°C avec 1 μ l de CFSE ou de CellTrace Violet (CTV; Invitrogen) à 5 μ M. Les DC ont été lavées deux fois avec du PBS puis resuspendues à 2×10^6 /ml. Les souris ont reçu 1×10^6 DC marquées au CFSE et 1×10^6 DC marquées au CTV

par voie intraveineuse. 36 heures après, les souris ont été sacrifiées et la survie des DC a été analysée par cytométrie (LSR II, BD). Le logiciel FlowJo (TreeStar) a été utilisé pour les analyses. Le calcul des nombres absolus de DC récupérées dans la rate a été effectué en sélectionnant les cellules exprimant le CD11c et le CTV ou CFSE.

4.6 Statistiques

Les données ont été analysées par test de student non-pairé avec un intervalle de confiance de 95% en utilisant le programme GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software). Les courbes de survie ont été comparées par test de log-rank.

Résultats

5.1 L'absence du récepteur à l'IL-7 sur les cellules hématopoïétiques n'influence pas la sévérité de la GVHD

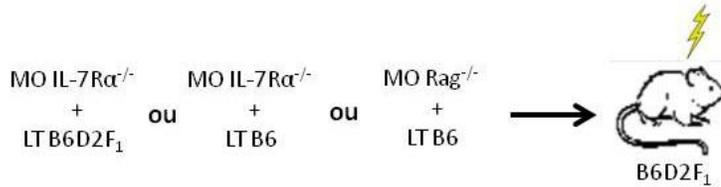
Notre laboratoire a récemment démontré que les niveaux élevés d'IL-7 affectaient la capacité des cellules dendritiques (DC) à soutenir la prolifération homéostatique (PH) des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans un hôte lymphopénique (Guimond et al., 2009). Étant donné que la GVHD affecte la reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, nous avons voulu déterminer si l'absence de lymphocytes T CD4⁺ associée à cette maladie était due à la signalisation de l'IL-7 sur les DC. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle murin de GVHD (C57BL/6 → B6D2F₁) dans lequel nous avons reconstitué des souris receveuses (B6D2F₁) avec de la moelle osseuse (MO) de souris donneuse C57BL/6 IL-7Rα^{-/-} pour régénérer une niche périphérique permissive à la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

Afin de s'assurer que l'absence du récepteur à l'IL-7 n'influence pas la sévérité de la GVHD, nous avons comparé la sévérité de la maladie chez des receveurs greffés avec de la MO IL-7Rα^{-/-} vs IL-7Rα^{+/+}. Comme la moelle osseuse IL-7Rα^{-/-} ne peut pas produire de lymphocytes T, nous avons choisi d'utiliser la moelle osseuse de souris Rag^{-/-} comme contrôle, cette moelle ne pouvant également pas produire de lymphocytes T mais détenant le récepteur à l'IL-7. Brièvement, nous avons greffé des souris B6D2F₁ avec de la moelle osseuse de souris C57BL/6 IL-7Rα^{-/-} ou C57BL/6 Rag1^{-/-} (IL-7Rα^{+/+}) supplémentée de 2x10⁶ lymphocytes T allogéniques provenant d'une souris normale C57BL/6 pour induire une GVHD (Figure 9A).

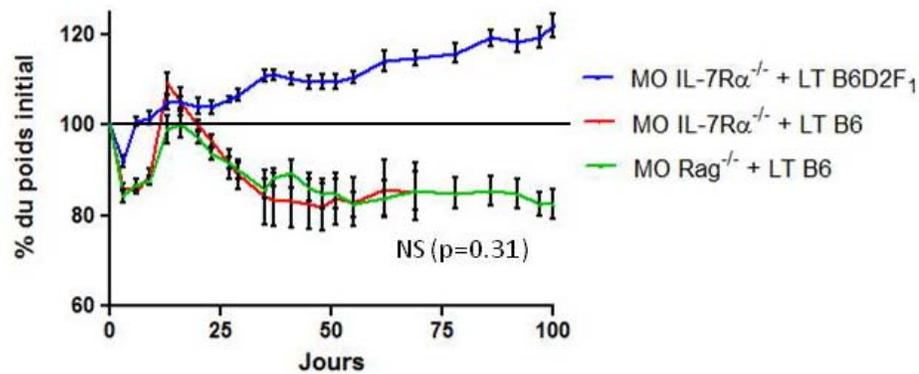
Parmi les critères utilisés pour mesurer la sévérité de la GVHD, nous avons analysé la perte et le gain de poids post-greffe. La valeur initiale du poids des souris a été mesurée avant l'irradiation et est représentée par 100%.

Au jour +3 post-greffe, les souris syngéniques (91,8 ± 1,3% du poids initial) ainsi que les souris allogéniques ont perdu du poids [IL-7Rα^{-/-}→B6D2F₁: 86,1 ± 0,8 % et Rag^{-/-}→B6D2F₁: 84,3 ± 1,6%] (Figure 9B). La perte de poids s'est poursuivie jusqu'au jour +6 post-greffe pour le groupe syngénique et jusqu'au jour +13 pour les groupes allogéniques. Au jour +16, toutes les souris ont récupéré leur poids initial [contrôle syngénique : 104,9 ± 1,2% ; IL-7Rα^{-/-}→B6D2F₁: 105 ± 3% et Rag^{-/-}→B6D2F₁: 99,9 ± 2,9%].

A



B



C

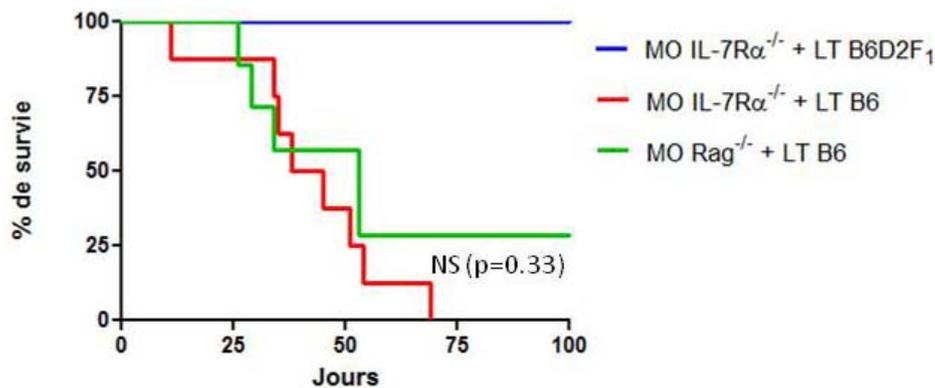


Figure 9 : GVHD et survie des souris. A) Schéma expérimental. Les souris receveuses B6D2F₁ ont été irradiées et greffées avec 10×10^6 de cellules de moelle osseuse (MO) de souris IL7Rα^{-/-} ou Rag^{-/-} et 2×10^6 de lymphocytes T (LT) B6D2F₁ ou B6. B) Poids des souris greffées. C) Courbe de survie des souris greffées. Les courbes ont été comparées en utilisant le test log-rank. Huit souris par groupe, représentatif de 2 expériences indépendantes. Bleu : contrôle syngénique, Rouge : GVHD avec MO IL-7Rα^{-/-}, vert : GVHD avec MO Rag^{-/-} (IL-7Rα^{+/+}).

Comme prévu, les souris greffées avec des lymphocytes T allogéniques recommencent à perdre du poids au jour +23 post-greffe [IL-7R α ^{-/-}→B6D2F₁ : 96,4 ± 1,4% et Rag^{-/-}→B6D2F₁ : 93,5 ± 1,3% vs 103,9 ± 1,5%] alors que les souris contrôles continuent à gagner du poids. Cette perte de poids est associée à l'apparition des signes cliniques de la GVHD (dos courbé, réflexe anormal d'extension des membres antérieurs, déplacement lent). La perte de poids chez les animaux en GVHD s'est poursuivie jusqu'à ce que leur poids atteigne 80% de leur poids initial et qu'il faille les sacrifier. Au jour +55 post-greffe, les deux groupes de souris en GVHD affichaient une perte de poids similaire [IL-7R α ^{-/-}→B6D2F₁ : 82,8 ± 5,4% et Rag^{-/-}→B6D2F₁ : 82,3 ± 2,7%]. De plus, les deux groupes de GVHD présentaient des courbes de survie similaires avec plus de 75% des animaux en GVHD décédés au jour +55 post-greffe (Figure 9C). Ces résultats démontrent que les souris B6D2F₁ greffées avec de la MO IL-7R α ^{-/-} ont une GVHD similaire à celle des souris qui ont reçu de la MO IL-7R α ^{+/+}. L'absence du récepteur à l'IL-7 sur les cellules hématopoïétiques ne semble donc pas affecter la sévérité de la GVHD.

5.2 La GVHD diminue la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺

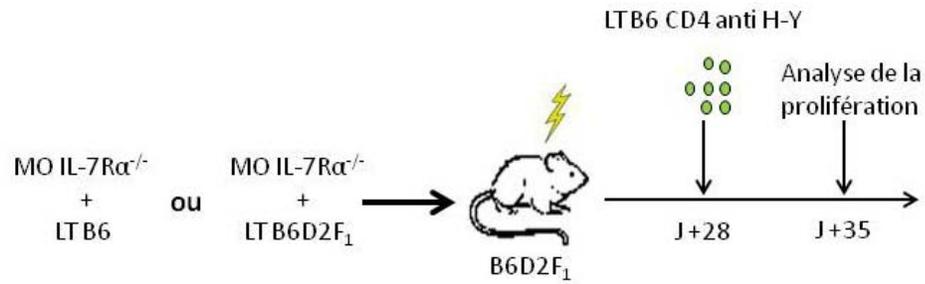
La GVHD est associée à une absence de reconstitution immunitaire des lymphocytes T CD4⁺ (Storek et al., 2008; Klyuchnikov et al., 2010; Fujimaki et al., 2001). Or, dans un hôte lymphopénique sans GVHD, les niveaux élevés d'IL-7 affectent les DC et diminuent leur capacité à soutenir la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Guimond et al., 2009). Sachant que les niveaux d'IL-7 sont aussi élevés dans un hôte en GVHD, nous avons voulu déterminer si la signalisation de l'IL-7 sur les DC pouvait aussi limiter la PH des lymphocytes T CD4⁺ dans ce contexte (Dean et al., 2008; Thiant et al., 2010). Pour vérifier cette possibilité, nous avons greffé des souris B6D2F₁ avec de la moelle osseuse de souris IL-7R α ^{-/-} afin de régénérer une niche périphérique lymphoïde (DC IL-7R α ^{-/-}) pouvant supporter la PH des lymphocytes T CD4⁺. Afin d'atténuer la sévérité de la GVHD et permettre la survie à long terme des animaux greffés, nous avons injecté seulement 1x10⁶ de lymphocytes alloréactifs. Il est important de mentionner que les souris greffées demeurent sévèrement lymphopéniques puisque la moelle osseuse des souris IL-7R α ^{-/-} et

Rag^{-/-} ne peuvent pas générer de lymphocytes T. La niche périphérique de ces souris sera donc vide et permettra d'étudier la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

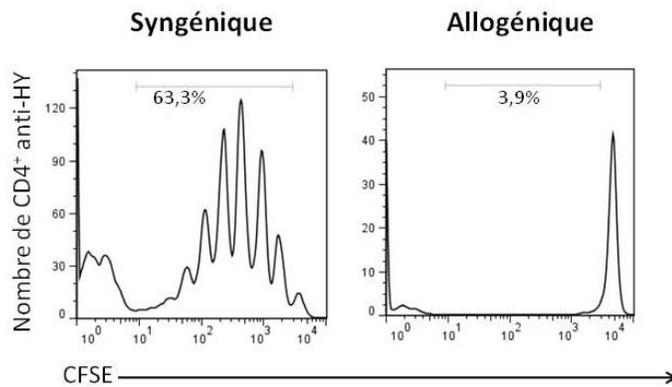
Au jour +28, nous avons confirmé la présence de la GVHD chez les souris qui avaient reçu des lymphocytes T allogéniques (GVHD : 88,9 ± 3,3% vs contrôle syngénique : 106,4 ± 1,3% du poids initial; p=0,003) (Figure 9B). À ce même moment, nous avons injecté des lymphocytes T CD4⁺ TCR transgéniques anti-HY provenant de souris Marilyn marqués au CFSE pour déterminer si la niche périphérique était encore capable de soutenir la PH des lymphocytes T CD4⁺. Sept jours après le transfert, les souris receveuses ont été sacrifiées afin d'évaluer la PH des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY (Figure 10A). Les lymphocytes T CD4⁺ anti-HY ne s'activent qu'en présence de l'antigène mâle HY. Ils ne pourront donc pas s'activer dans notre modèle. À l'inverse, ces lymphocytes sont de même fond génétique que le donneur et tolérés par le receveur, ce qui les empêche d'être directement éliminés. Ceci permet de nous assurer que la prolifération étudiée est bien due à la PH.

Dans un hôte sans GVHD, 63,3% des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY sont en expansion homéostatique (Figure 10B). Cette prolifération est accompagnée d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ anti-HY retrouvés dans la rate (2,9 ± 0,6x10⁶ vs 1x10⁶ au départ). Contrairement au groupe syngénique, les lymphocytes T CD4⁺ anti-HY injectés dans des souris en GVHD n'ont pas dilué leur CFSE (Figure 10B). L'absence de prolifération homéostatique est associée à une diminution du nombre de cellules récupérées dans la rate [contrôle syngénique : 2,9 ± 0,6x10⁶ vs GVHD : 0.4 ± 0,1x10⁶] (Figure 10C). Ces résultats démontrent que la PH des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY est possible dans un hôte reconstitué avec de la moelle osseuse IL-7Rα^{-/-}. Par contre, en présence d'une GVHD, la PH des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY est absente et ceci en dépit d'une niche permissive à leur prolifération. Ces résultats démontrent que la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs n'est pas possible dans un hôte en GVHD et que la signalisation de l'IL-7 sur les DC n'est pas le facteur limitant leur prolifération dans ce contexte.

A



B



C

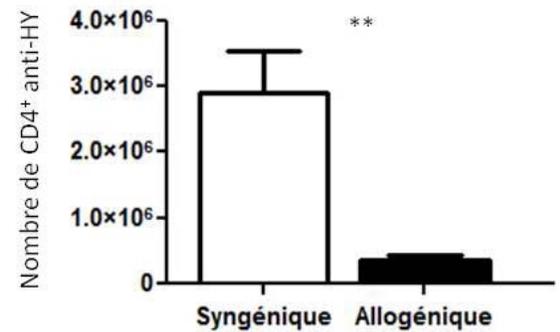


Figure 10 : Prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY. A) Schéma expérimental. Des cellules de moelle osseuse d'une souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ ont été injectées avec des lymphocytes T de souris B6 ou B6D2F₁ par voie intraveineuse à des souris B6D2F₁ irradiées. Au jour +28 post-greffe, les lymphocytes T CD4 anti-HY purifiés ont été marqués au CFSE et injectés par voie intraveineuse dans les souris. Les souris ont été par la suite sacrifiées au jour +35 et la prolifération des lymphocytes T CD4 anti-HY a été analysée par FACS. MO : moelle osseuse; LT : lymphocytes T; vert : CFSE. B) Prolifération des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY au jour +35 post-greffe. C) Nombre absolu des lymphocytes T CD4⁺ anti-HY retrouvés dans la rate (moyenne \pm SE). Trois souris par groupe, représentatif de 2 expériences. ** Test de Student ($p < 0,001$).

5.3 L'absence de prolifération homéostatique n'est pas due à une mauvaise prise du greffon

Avant la greffe de moelle osseuse, les souris receveuses sont traitées par irradiation afin de détruire leur système hématopoïétique. Ceci libère de l'espace et permet ainsi à la moelle osseuse du donneur de s'établir et de reconstituer un nouveau système hématopoïétique. Dans les semaines qui suivent la greffe hématopoïétique, la MO du receveur est graduellement remplacée par la MO du donneur. Afin de permettre la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺, la prise du greffon IL-7R α ^{-/-} doit s'effectuer pour produire des DC IL-7R α ^{-/-}. Or, les lymphocytes T CD4⁺ ne peuvent pas proliférer dans un hôte en GVHD. Il est donc possible que la GVHD empêche la prise du greffon.

Afin de s'assurer que l'absence d'expansion des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans les souris en GVHD n'est pas due à une mauvaise prise du greffon, nous avons effectué de nouvelles greffes IL-7R α ^{-/-} → B6D2F₁ mais cette fois-ci en transférant de la moelle IL-7R α ^{-/-} CD45.1. Puisque la souris receveuse B6D2F₁ détient la forme allélique CD45.2, nous avons pu différencier les cellules du donneur et du receveur et ainsi analyser le chimérisme des souris au niveau de la moelle osseuse 35 jours post-greffe. À cette période, 79,3% des cellules de la moelle osseuse proviennent du donneur (CD45.1) tandis que 20,7% des cellules sont encore de type receveur (Figure 11A-B).

Comme pour les souris syngéniques, le système hématopoïétique des souris allogéniques découle presque complètement des cellules du donneur 35 jours post-greffe. Quasiment 100% des cellules de la moelle expriment le CD45.1 (Figure 11A-B).

Ces résultats démontrent que 35 jours post-greffe, le système hématopoïétique du receveur provient en grande partie de la moelle du donneur. De plus, les DC retrouvées dans la rate des souris syngéniques et allogéniques 35 jours post-greffe expriment le CD45.1 démontrant ainsi qu'elles proviennent uniquement du donneur (IL-7R α ^{-/-}) ce qui nous permet de conclure que l'absence de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans ces souris n'est pas due à une mauvaise implantation du greffon (Figure 11C).

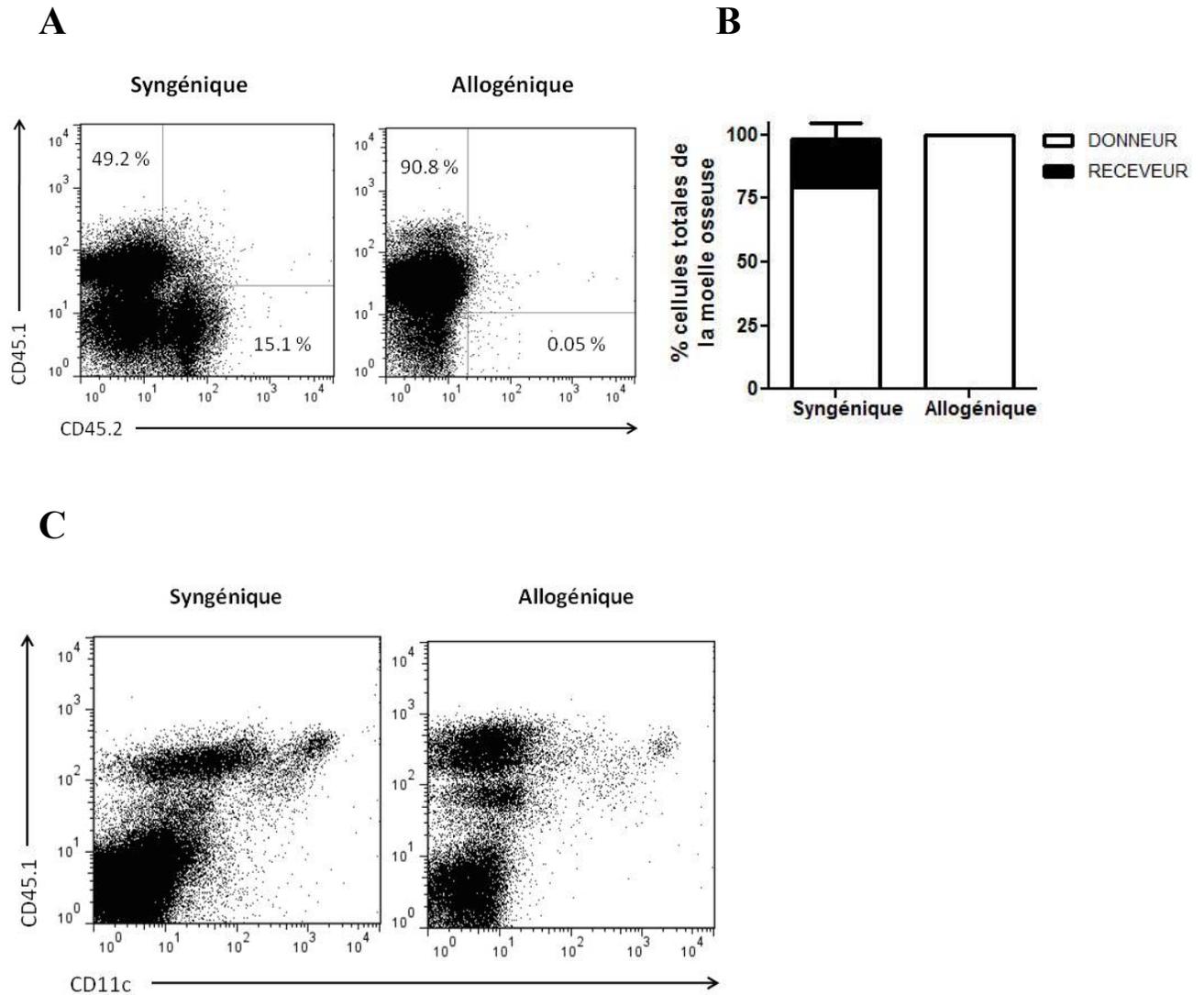


Figure 11: Chimérisme donneur-receveur des souris B6D2F₁ au jour +35 post-greffe.

Les souris B6D2F₁ CD45.2 ont été irradiées et transplantées avec 10×10^6 cellules de moelle osseuse d'une souris IL-7R $\alpha^{-/-}$ CD45.1 et 1×10^6 lymphocytes T de souris B6.SJL (CD45.1).

A) Profil de cytométrie du chimérisme dans la moelle osseuse de la souris receveuse B6D2F₁ au jour +35 post-greffe. CD45.1 = donneur; CD45.2 = receveur. B) Représentation graphique du chimérisme donneur (blanc) contre receveur (noir) au niveau de la moelle osseuse des souris receveuses B6D2F₁. Ajustement à 100% en enlevant les cellules CD45.1⁻CD45.2⁻ et les cellules CD45.1⁺CD45.2⁺. C) Profil de cytométrie représentant le chimérisme des DC au niveau de la rate des souris receveuses B6D2F₁ au jour +35 post-greffe. CD45.1 : cellules du donneur. 3 souris par groupe; représentatif de 2 expériences.

5.4 La GVHD entraîne une diminution du nombre de cellules dendritiques 35 jours post-greffe

L'absence de PH pourrait impliquer un défaut au niveau de l'IL-7 ou des DC. Sachant que la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs est absente lors de la GVHD, et ce même si les DC ne répondent pas à l'IL-7, nous avons voulu vérifier si ces cellules étaient présentes lors de la maladie. Afin de s'assurer de la présence des DC au moment de la GVHD, nous les avons analysées au jour +35 post-greffe. En se fiant aux marqueurs CD11c et CD11b, nous avons constaté que les DC des souris syngéniques étaient présentes au jour +35 post-greffe (Figure 12A). Par contre, le nombre DC du groupe allogénique était grandement diminué au jour +35 post-greffe. On en retrouve d'ailleurs environ 5 fois moins dans le groupe GVHD comparativement au groupe contrôle [GVHD : $1,5 \pm 0,4 \times 10^5$ vs contrôle : $8,2 \pm 2,6 \times 10^5$; $p=0,01$] (Figure 12B). Tous les types de DC semblent être affectés puisque nous observons une diminution du nombre de cellules CD11c⁺CD11b⁺ [GVHD : $0,4 \pm 0,1 \times 10^5$ vs contrôle : $2,1 \pm 0,7 \times 10^5$; $p=0,03$], CD11c⁺CD11b⁻ [GVHD : $0,9 \pm 3,1 \times 10^5$ vs contrôle : $2,5 \pm 0,9 \times 10^5$; $p=0,09$] et CD11c⁺CD11b⁻B220^{int}mPDCA-1⁺ [GVHD : $1,2 \pm 0,5 \times 10^4$ vs contrôle : $4,8 \pm 2,3 \times 10^4$; $p=0,12$] (Figure 12C-D).

Ces résultats indiquent que la GVHD interfère avec la reconstitution des DC après une greffe de moelle osseuse allogénique.

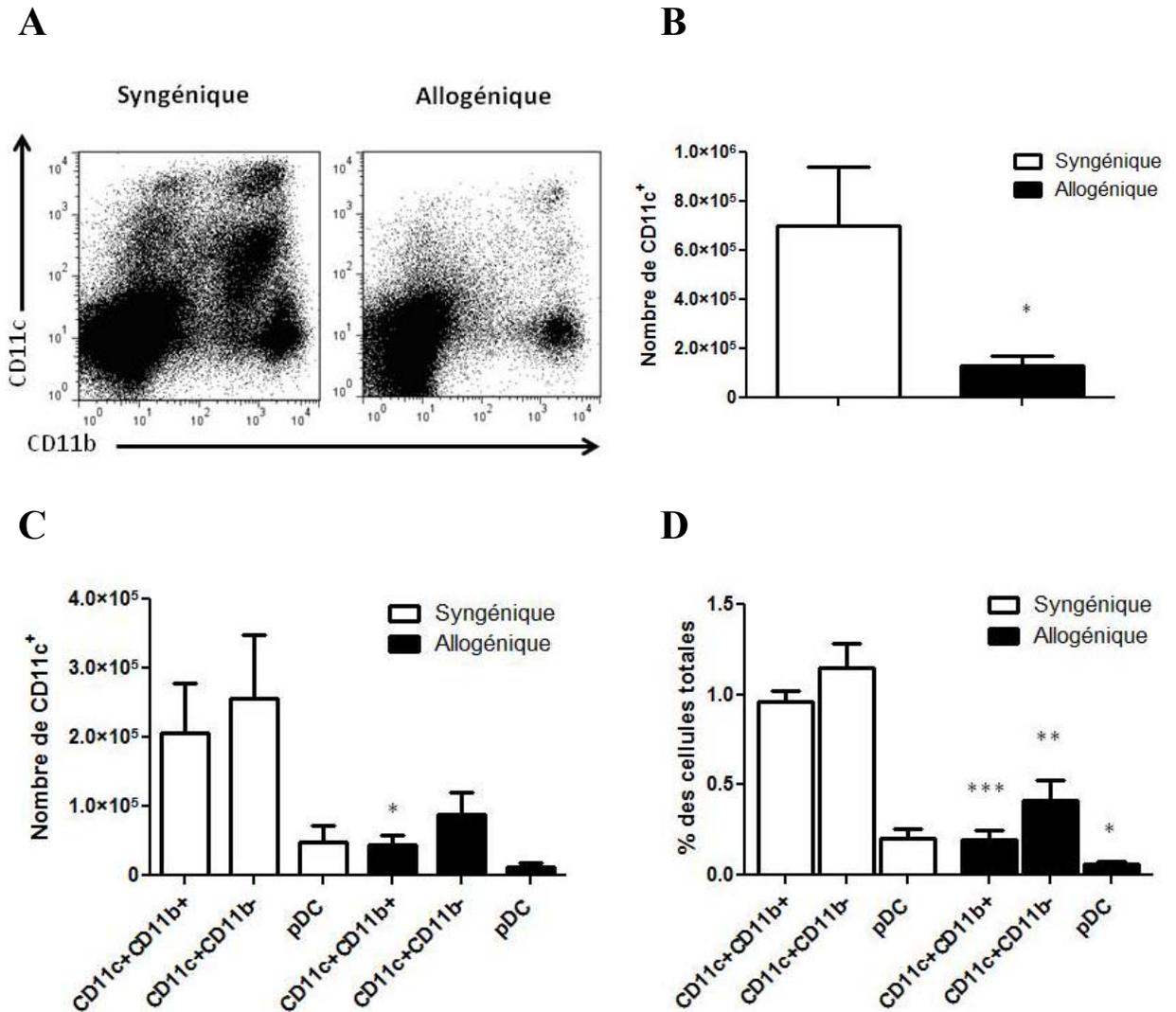


Figure 12 : Analyse des cellules dendritiques au jour +35 post-greffe. Les souris receveuses B6D2F₁ ont été transplantées comme expliqué précédemment. Les DC de la rate ont été analysées au jour +35 par cytométrie en flux. A) Profil de cytométrie représentant les DC CD11c⁺CD11b⁻, CD11c⁺CD11b⁺ dans la rate au jour +35 post-greffe. B) Nombre absolu de cellules CD11c⁺ totales dans la rate des souris greffées. C) Nombre absolu de cellules CD11c⁺CD11b⁻, CD11c⁺CD11b⁺ et CD11c⁺CD11b⁻B220^{int}mPDCA⁺ dans la rate au jour +35 post-greffe. D) Graphique représentant les pourcentages de cellules CD11c⁺CD11b⁻, CD11c⁺CD11b⁺ et CD11c⁺CD11b⁻B220^{int}mPDCA⁺ retrouvées dans la rate au jour +35 post-greffe. pDC : DC plasmacytoïde (CD11c⁺CD11b⁻B220^{int}mPDCA⁺). 3 souris par groupe; représentatif de 2 expériences. * Test de Student (p<0,005), ** Test de Student (p<0,001).

5.5 Les cellules dendritiques du donneur générées dans le receveur peuvent être détruites suite au transfert de lymphocytes T du donneur

La GVHD est induite par l'activation des lymphocytes T du donneur présents dans le greffon. Il a déjà été démontré que, dans le cas d'une greffe de moelle osseuse, les DC générées à partir de la moelle du donneur ont la possibilité d'acquérir des peptides du receveur et de les présenter grâce à leur CMH (Ferrara et al., 2009; Shlomchik, 2007). Ceci permet d'activer les lymphocytes T du donneur et ainsi prolonger la GVHD lorsque les DC de l'hôte sont détruites. Lors d'une réaction immunitaire, les lymphocytes T activés ont la possibilité d'éliminer les DC qui présentent les antigènes étrangers, certainement pour diminuer l'intensité de la réponse immunitaire (Yang et al., 2006; Guarda et al., 2007). Nous avons donc émis l'hypothèse que, comme dans le cas d'une réponse immunitaire, les lymphocytes T alloréactifs ont la possibilité d'éliminer les DC qui présentent des antigènes du receveur.

Afin de démontrer que les DC B6 du donneur générées dans un hôte B6D2F₁ peuvent être reconnues et détruites par les lymphocytes T B6, nous avons généré des souris chimères B6Rag^{-/-}→B6D2F₁ (Figure 13A). Les souris ont été laissées de côté durant 8 semaines afin de s'assurer que les cellules souches hématopoïétiques du donneur puissent produire de nouvelles DC. Après 8 semaines, 10x10⁶ lymphocytes T B6 ont été injectés par voie intraveineuse aux chimères B6→B6D2F₁. Il est à noter que dans ce contexte, les souris ne sont pas irradiées comme dans un contexte de GVHD, et de ce fait l'inflammation est drastiquement diminuée au moment de l'injection. C'est pourquoi nous avons décidé d'injecter dix fois plus de lymphocytes T afin d'avoir une réponse plus rapide. Une même quantité de lymphocytes T B6D2F₁ a été injectée comme contrôle à un autre groupe. Deux semaines plus tard, les souris ont été sacrifiées et les DC de la rate analysées par cytométrie en flux grâce à l'expression des marqueurs CD11c et CD11b.

Suite à l'injection de lymphocytes T, on observe moins de DC dans les souris injectées avec des lymphocytes T B6 alloréactifs comparativement à des souris injectées avec des lymphocytes T B6D2F₁ syngéniques (Figure 13B). En effet, les souris Rag^{-/-}→B6D2F₁ injectées avec des lymphocytes T B6 ont environ 2 fois moins de DC CD11c⁺CD11b⁺ [B6 :

$1,5 \pm 0,2 \times 10^5$ vs B6D2F₁ : $3,2 \pm 0,1 \times 10^5$; $p=0,01$], 2 fois moins de DC CD11c⁺CD11b⁻ [B6 : $1 \pm 0,2 \times 10^5$ vs B6D2F₁ : $1,8 \pm 0,2 \times 10^5$; $p=0,1$) et près de 5 fois moins de DC CD11c⁺CD11b⁻B220^{int}m-PDCA⁺ [B6 : $0,5 \pm 0,2 \times 10^4$ vs B6D2F₁ : $2,4 \times 10^4$; $p=0,005$) (Figure13C-D).

Ces résultats indiquent que les cellules dendritiques du donneur qui présentent des peptides du receveur (B6D2F₁) peuvent être éliminées suite au transfert de lymphocytes T du donneur.

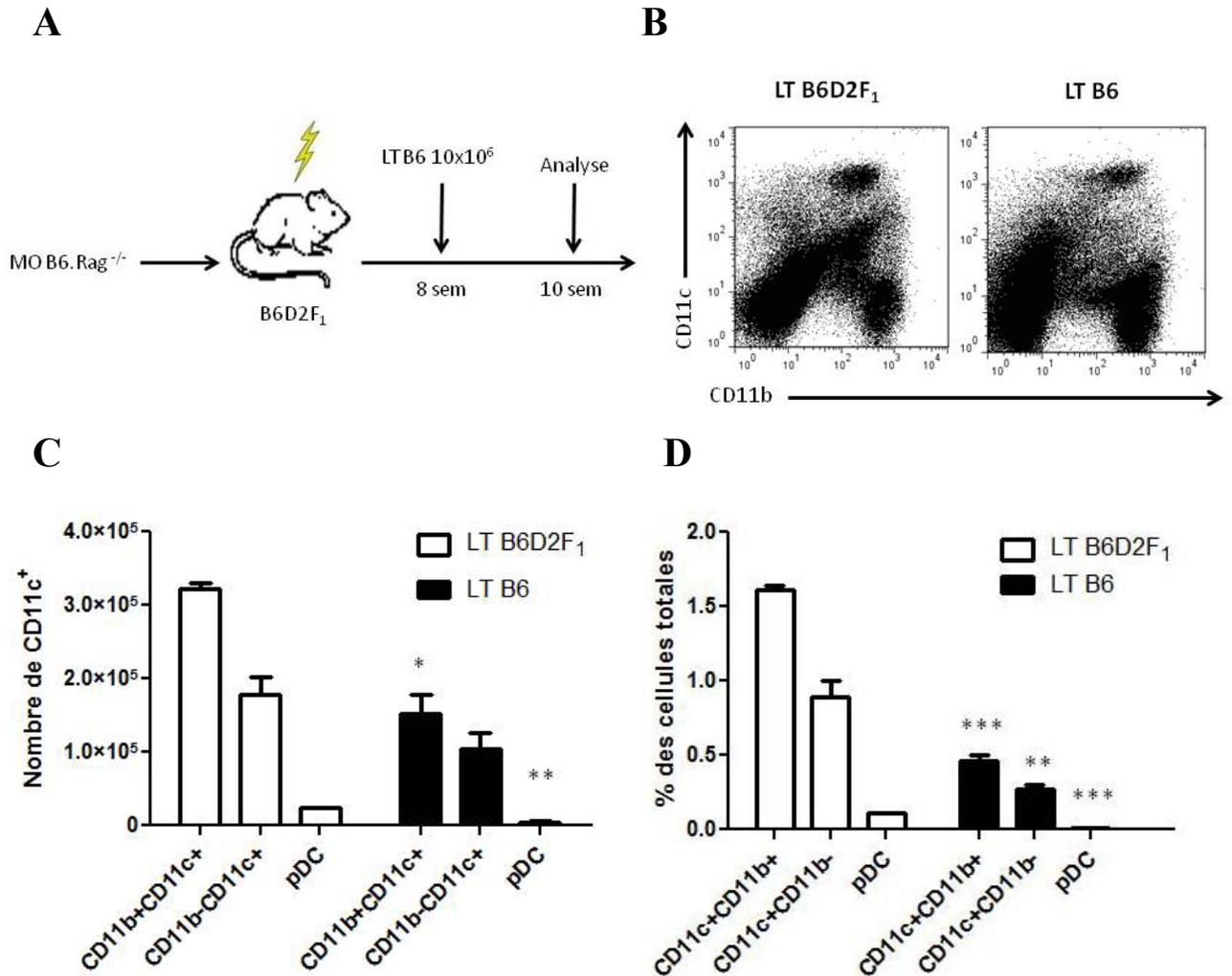


Figure 13: Élimination des cellules dendritiques suite au transfert de lymphocytes T alloréactifs. A) Schéma expérimental. 10×10^6 cellules de MO provenant d'une souris $Rag^{-/-}$ ont été injectées à une souris receveuse B6D2F₁ irradiée. Huit semaines post-greffe, les souris chimères $Rag^{-/-} \rightarrow B6D2F_1$ ont reçu par voie intraveineuse 10×10^6 lymphocytes T B6 ou B6D2F₁. Deux semaines après, les souris ont été sacrifiées et les DC de la rate analysées par cytométrie en flux. MO : moelle osseuse; LT : lymphocytes T. B) Profil de cytométrie représentant les DC au niveau de la rate dans les souris chimères $Rag^{-/-} \rightarrow B6D2F_1$ deux semaines après injection de lymphocytes T B6D2F₁ ou B6. C) Graphique représentant les nombres absolus de DC dans la rate des souris greffées 2 semaines après le transfert de lymphocytes T B6 (n=6) ou B6D2F₁ (n=4). D) Graphique représentant les pourcentages de DC dans la rate des souris greffées 2 semaines après le transfert de lymphocytes T B6 (n=6) ou B6D2F₁ (n=4). Représentatif de 2 expériences.

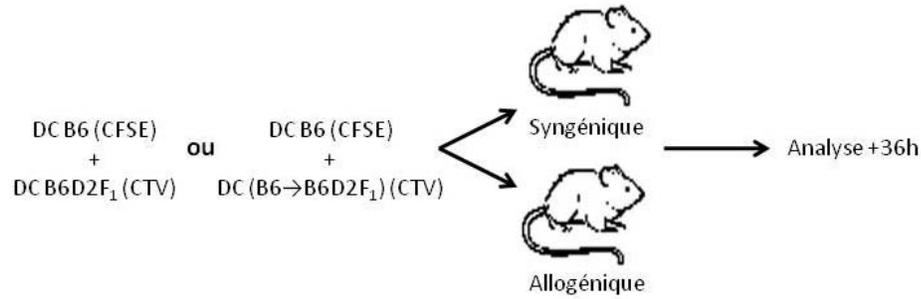
5.6 Les cellules dendritiques du donneur générées dans le receveur sont éliminées dans les souris en GVHD

Nous avons démontré que des lymphocytes T B6 transférés dans une souris chimère B6→B6D2F₁ peuvent diminuer le nombre de cellules dendritiques 2 semaines après le transfert. Afin de confirmer que les cellules dendritiques du donneur générées dans le receveur allogénique peuvent être détruites lors d'une GVHD, nous avons mis au point un test de cytotoxicité *in vivo*. Pour cela, nous avons isolés les DC de la rate de souris B6, B6D2F₁ et chimères B6→B6D2F₁. Les DC B6 ont été marquées au CFSE tandis que les DC B6D2F₁ et B6→B6D2F₁ ont été marquées au CellTrace Violet (CTV). Les DC B6 ont par la suite été coinjectées à un ratio 1:1 dans des souris en GVHD ou non avec des DC B6D2F₁ ou des DC B6→B6D2F₁ (Figure 14A).

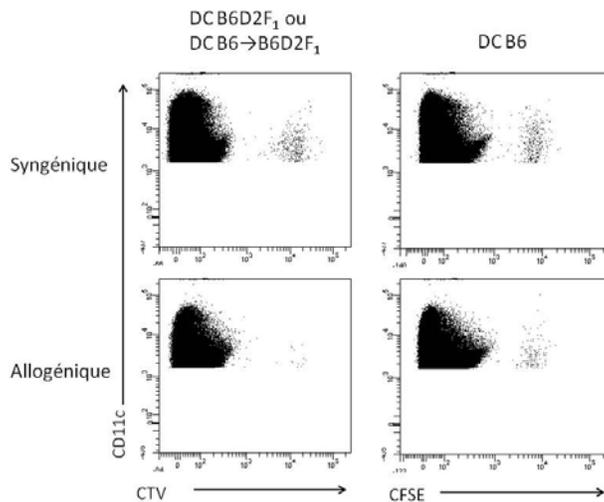
Les DC provenant d'une souris B6 sont syngéniques aux lymphocytes T B6 alloréactifs que l'on retrouve dans la souris en GVHD. De ce fait, les lymphocytes T ne devraient pas les détruire. Nous les avons donc utilisées comme contrôle négatif. Les DC provenant d'une souris B6D2F₁ sont reconnues directement par les lymphocytes T alloréactifs lors du déclenchement de la GVHD. Elles seront donc éliminées et serviront de contrôle positif. Trente-six heures après injection des DC, les souris ont été sacrifiées et la rate analysée par cytométrie en flux (Figure 14B). Les résultats sont exprimés sous forme de ratio des nombres de DC B6D2F₁ ou B6→B6D2F₁ sur le nombre de DC B6. Dans les souris qui ne sont pas atteintes de GVHD (syngénique), les DC marquées au CFSE et au CTV sont retrouvées en quantité similaire avec un ratio B6D2F₁/B6 ou B6→B6D2F₁/B6 près de 1 (Figure 14C). Par contre, à l'analyse des souris en GVHD, on observe beaucoup moins de DC marquées au CTV que de DC marquées au CFSE. Le ratio des DC B6D2F₁ sur DC B6 est de 0,2 (p=0,002) et celui des DC B6→B6D2F₁ sur DC B6 est de 0,3 (p=0,004).

Ces résultats démontrent que les DC du donneur (B6) générées dans le receveur B6D2F₁ peuvent être éliminées lors d'une GVHD, certainement par les lymphocytes T alloréactifs du donneur, bien que nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur ce point.

A



B



C

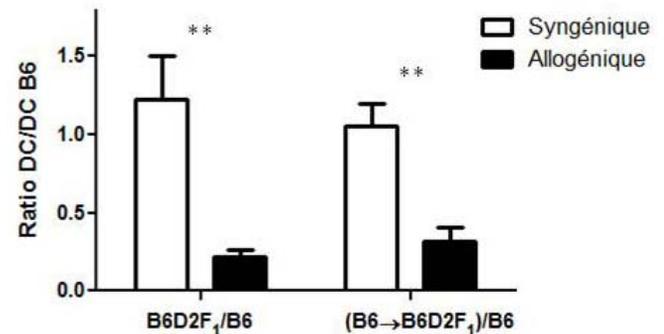


Figure 14: Cytotoxicité *in vivo* des cellules dendritiques dans les souris en GVHD. A) Schéma expérimental. Les DC de souris B6, B6D2F₁ et chimères (B6→B6D2F₁) ont été isolées par sélection positive et marquées au CFSE (DC B6) ou au CTV (DC B6D2F₁ et DC (B6→B6D2F₁)). Les DC ont par la suite été transférées à des ratios 1:1 dans des souris en GVHD ou non. 36h après, les souris ont été sacrifiées et les DC transférées analysées par cytométrie en flux. B) Profil de cytométrie des DC transférées dans les souris en GVHD ou non après 36h. C) Graphique représentant le ratio entre le nombre de DC B6D2F₁ ou DC (B6→B6D2F₁) sur le nombre de DC B6 retrouvées dans la rate des souris sacrifiées. ≥ 2 souris par groupe; représentatif de 3 expériences. * Test de Student ($p < 0,005$), ** Test de Student ($p < 0,001$).

Discussion

6.1 Influence du milieu sur la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺

La lymphopénie est une des principales complications associée à la GVHD et prédispose les patients aux rechutes et aux infections opportunistes. Cette complication est due à l'absence de production *de novo* de lymphocytes T par le thymus, qui a été endommagé par le régime de préparation et la GVHD, ainsi qu'à la mort précoce des lymphocytes T matures situés en périphérie qui semblent beaucoup plus sensibles à l'apoptose (Brochu et al., 1999). Contrairement aux lymphocytes T CD8⁺ qui se régénèrent facilement par prolifération homéostatique, l'absence de lymphocytes T CD4⁺ perdure pendant plusieurs années post-greffe (Mackall et al., 1995; Fujimaki et al., 2001; Storek, 2008).

Notre laboratoire a récemment démontré qu'à la différence des lymphocytes T naïfs CD8⁺ qui répondent efficacement aux niveaux élevés d'IL-7 dans un hôte lymphopénique, les lymphocytes T naïfs CD4⁺ prolifèrent moins efficacement (Guimond et al., 2009). Aussi, les DC semblent être affectées par l'IL-7 puisque des niveaux élevés de cette cytokine dans des hôtes lymphopéniques sont associés à une diminution de l'expression du CMH II à leur surface. En empêchant la signalisation de l'IL-7 sur les cellules dendritiques, comme dans une souris IL-7R α ^{-/-}, l'expression du CMH II est rétablie, et ce bien que les niveaux d'IL-7 systémiques soient toujours aussi élevés. Donc, dans un contexte de lymphopénie, les cellules dendritiques IL-7R α ^{-/-} peuvent soutenir et rétablir la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs CD4⁺.

Étant donné que les niveaux d'IL-7 sont également élevés dans la lymphopénie causée par la GVHD, nous avons voulu déterminer s'il était possible dans ce contexte de restaurer la PH des lymphocytes T CD4⁺ en interférant avec la signalisation de l'IL-7 sur les DC (Dean et al., 2008; Thiant et al., 2010). Pour cela, nous avons injecté dans des souris femelles en GVHD des lymphocytes T CD4⁺ naïfs TCR anti-HY marqués au CFSE. Ces lymphocytes T CD4⁺ anti-HY, qui proviennent de souris Marilyn, sont de même fond génétique que le donneur et tolérés par le receveur, ce qui les empêche d'être directement éliminés. À

l'inverse, les lymphocytes T CD4⁺ anti-HY ne s'activent qu'en présence d'antigène mâle ce qui nous assure que la prolifération observée n'est pas due à leur activation. Le transfert de ces lymphocytes nous permet donc de mesurer très précisément la capacité de la niche périphérique à soutenir la prolifération homéostatique.

Sept jours après leur injection, les lymphocytes T CD4⁺ transférés dans les souris en GVHD n'ont pas proliféré. Ceci n'est pas dû à une mauvaise implantation des cellules de moelle osseuse lors de la greffe puisque la majorité des cellules de la rate et de la moelle osseuse proviennent du donneur au moment du transfert des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. À l'inverse, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs transférés dans des souris sans GVHD prolifèrent efficacement ce qui suggère que les cellules dendritiques générées dans un hôte à partir de moelle osseuse IL-7R α ^{-/-} peuvent bien soutenir la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Ces résultats indiquent que contrairement à un état de lymphopénie classique, l'IL-7 n'est pas le facteur qui limite la prolifération homéostatique dans un contexte de GVHD. Gorski et ses collègues proposent que l'absence de prolifération homéostatique des lymphocytes T est due à l'environnement de la GVHD (Gorski et al., 2007). Ils démontrent que des lymphocytes T isolés à partir de la rate de souris en GVHD ont la capacité de proliférer lorsqu'ils sont transférés dans un hôte secondaire sans GVHD. Cette hypothèse concorde avec les observations de Dulude et ses collègues qui démontrent que des lymphocytes T tolérants l'hôte ne peuvent pas proliférer lorsqu'ils sont transférés dans une souris en GVHD (Dulude et al., 1999). À l'inverse, des lymphocytes T isolés d'un animal en GVHD peuvent proliférer dans des hôtes secondaires thymectomisés. Ce constat s'applique également à nos résultats puisque des lymphocytes T CD4⁺ naïfs transférés dans une souris greffée mais sans GVHD peuvent proliférer. Comme le démontre Brochu ainsi que Delisle et ses collègues, il est possible que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs une fois injectés dans l'hôte en GVHD meurent par contact avec les lymphocytes T alloréactifs qui expriment FasL (Brochu et al., 1999; Delisle et al., 2008). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer l'expression du récepteur Fas à la surface des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que la proportion de ces cellules en apoptose par marquage au BrDu. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont besoin d'IL-7 pour survivre. Cependant, les niveaux élevés d'IL-7 régulent négativement l'expression de l'IL-7R et diminuent la signalisation (Park et al., 2004). Il est possible que nos lymphocytes T CD4⁺ naïfs meurent

par apoptose car ils ne peuvent plus répondre à l'IL-7 (Park et al., 2004). Encore une fois, un marquage au BrDu, ou même la mesure de l'expression de Bcl-2, sur des lymphocytes T CD4⁺ fraîchement isolés nous permettrait de répondre à cette question. Les niveaux d'IL-7 sont reconnus comme étant très élevés chez l'humain dans un contexte de GVHD (Dean et al., 2008; Thiant et al., 2010). Ceci n'a pas encore été démontré chez la souris et il serait important de confirmer la concentration élevée d'IL-7 dans un contexte de GVHD murine. De manière alternative, la mesure de l'expression de l'IL-7R à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs pourrait nous indiquer si les niveaux d'IL-7 sont bien élevés.

6.2 Diminution des cellules dendritiques dans un hôte en GVHD

Les lymphocytes T naïfs ont besoin d'une stimulation TCR-peptide du soi-CMH pour survivre et proliférer (Takada et Jameson, 2009; Jameson, 2002). Il se pourrait que lors de la GVHD, la destruction des organes lymphoïdes ou la diminution du nombre de ces cellules exprimant le CMH II en périphérie diminue la possibilité d'interaction entre le TCR et le CMH II et limite la survie des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Puisqu'il a été démontré que les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle important dans la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, nous avons décidé d'étudier ces cellules dans un hôte en GVHD (Guimond et al., 2009). Nous observons dans notre modèle une diminution de tous les types de DC au niveau de la rate d'un hôte en GVHD environ un mois après la greffe. Cette diminution du nombre de DC semble persister durant la GVHD puisque leur nombre est toujours très bas 5 mois après la greffe de moelle osseuse (observation par S.D.G.). Il semble qu'à notre connaissance, nous soyons les premiers à étudier la diminution des DC en périphérie suite à une greffe de moelle osseuse allogénique dans un modèle murin. Pourtant, la déplétion des DC chez l'humain après une greffe de moelle osseuse est un phénomène connu (Horváth et al., 2009; Porta et al., 2004; Reddy et al., 2004; Vakkila et al., 2005). Plusieurs études démontrent une déplétion sévère des DC chez les patients en GVHD. La sévérité de la déplétion des DC est d'ailleurs associée à l'intensité de la GVHD ainsi qu'à de plus hauts taux de rechutes et une diminution des chances de survie. Un mois après la greffe de moelle osseuse, presque la totalité des DC retrouvées dans la rate des souris sans GVHD, et en plus faible quantité dans les souris en GVHD, provient du donneur. Il a été démontré que les DC du receveur sont importantes

pour déclencher la GVHD et qu'elles sont rapidement éliminées par les lymphocytes T alloréactifs (Ferrara et al., 2009; Shlomchik, 2007). Suite à l'élimination des DC du receveur, les DC du donneur ont été décrites comme étant capable d'accentuer la GVHD en présentant des antigènes de l'hôte (Matte et al., 2004). Plusieurs études qui se sont intéressées au sort des DC durant une réponse immunitaire ont découvert la capacité des lymphocytes T CD8⁺ activés ou mémoires à éliminer les DC présentant des antigènes étrangers par le CMH I (Hermans et al., 2000; Mueller et al., 2006; Yang et al., 2006; Guarda et al., 2007). Puisque dans un contexte de GVHD les DC du donneur ont la capacité de présenter les antigènes de l'hôte, nous avons émis l'hypothèse que les DC étaient éliminées par les lymphocytes T alloréactifs. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons généré des souris chimères et attendu deux mois afin de permettre la régénération des DC. Puis, nous avons injecté des lymphocytes T alloréactifs à l'hôte mais syngéniques et tolérants aux cellules hématopoïétiques du même donneur. Si notre hypothèse s'avère vraie, les lymphocytes T du donneur devraient être capables d'éliminer les DC du donneur générées dans le receveur. En effet, deux semaines après avoir transféré les lymphocytes T du donneur dans les souris chimères, nous observons une diminution significative du nombre de DC présentes dans la rate des souris. Bien que la déplétion des DC soit plus faible que dans un contexte de GVHD, ce modèle appuie fortement l'hypothèse que l'élimination des DC est en partie causée par les lymphocytes T alloréactifs. Cependant, ce modèle ne reflète pas le contexte inflammatoire, lymphopénique et alloréactif de la GVHD.

Afin de s'assurer que ce mécanisme ait bien lieu dans une souris en GVHD, nous avons effectué un test de cytotoxicité *in vivo* en transférant des DC provenant soit du receveur (B6D2F₁), soit de souris chimères (B6→B6D2F₁), en combinaison avec des DC du donneur (B6) dans des souris en GVHD. Trente-six heures après l'injection, les DC du receveur sont éliminées dans les souris en GVHD. Les DC du donneur sont quant à elles épargnées. Par contre, les DC du donneur qui ont été générées dans un receveur sont éliminées comme les DC du receveur. Ceci indique donc que les DC du donneur peuvent être éliminées dans un hôte en GVHD par les lymphocytes T alloréactifs du donneur si elles présentent des antigènes de l'hôte. Nos résultats ne démontrent pas hors de tout doute que les DC sont éliminées par les lymphocytes T alloréactifs durant la GVHD ni par quel mécanisme les lymphocytes T élimineraient les DC. Les études s'intéressant au sort des DC

dans un contexte de réponse immunitaire classique s'entendent sur l'importance de la sécrétion de perforine et de granzyme par les lymphocytes T dans leur élimination (Yang et al., 2006; Medema et al., 2001; Watchmaker et al., 2008). Nous n'avons cependant pas étudié cet aspect de la cytotoxicité.

L'élimination des DC chimères (B6→B6D2F₁) dans un hôte en GVHD implique qu'elles ont la capacité de présenter des antigènes de l'hôte. Ceci pourrait se faire soit par présentation via la voie exogène classique (CMH II), soit par présentation croisée (CMH I), ou soit par trogocytose (maintenant appelée dans le cas des DC « cross-dressing »). La présentation croisée nécessite la phagocytose des antigènes exogènes par les DC puis la présentation de peptides via le CMH I (Jensen, 2007). Ceci permettrait la reconnaissance des peptides de l'hôte et l'élimination des DC par les lymphocytes T CD8⁺ alloréactifs. Le « cross-dressing » implique simplement le transfert de complexes peptide-CMH déjà formés d'une cellule à une DC suite au contact des deux cellules (Wakim et Bevan, 2011). Cette voie de présentation permettrait la reconnaissance des peptides présentés par les CMH I et II par les lymphocytes T CD4⁺ ou CD8⁺ alloréactifs respectivement.

6.3 Diminution des cellules dendritiques due à une mauvaise reconstitution ?

La diminution du nombre de DC dans les souris en GVHD peut aussi être causée par un défaut de régénération de ces cellules au niveau de la moelle osseuse. Shono et ses collègues démontrent que lors d'une GVHD, le stroma de la moelle osseuse n'est pas en mesure de soutenir la reconstitution hématopoïétique des lymphocytes B (Shono et al., 2010). Ceci est dû à la destruction des ostéoblastes qui semblent jouer un rôle important dans le maintien des niches hématopoïétiques ainsi que dans le renouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Malheureusement, Shono et ses collègues se sont concentrés sur l'absence de reconstitution des lymphocytes B et n'ont pas étudié les cellules dendritiques. Toutefois, Banovic et ses collègues ont remarqué en étudiant le rôle des pDC dans la greffe de moelle osseuse allogénique qu'il y avait une absence de reconstitution des pDC du donneur lors de la GVHD (Banovic et al., 2009). Plus précisément, il semble qu'il y ait une accumulation d'un type de cellules

correspondant aux pre-DC permettant ainsi aux auteurs de conclure que la GVHD entraînerait possiblement un retard ou un arrêt de maturation de ces cellules soit par un signal inhibiteur des cytokines proinflammatoires, soit par l'absence d'un facteur de croissance nécessaire à la maturation de ces cellules comme le Flt3-ligand (FL). D'ailleurs, les auteurs démontrent que la mise en culture *in vitro* de ces pre-DC en présence de FL permet la génération de pDC matures. Nous sommes nous-mêmes en train d'étudier la production de FL par le stroma dans la moelle osseuse de souris en GVHD et la possibilité de régénérer la niche périphérique des souris greffées en leur injectant du FL. Des résultats préliminaires indiquent qu'il est effectivement possible de régénérer cette niche (observations de S.D.G). Il nous reste néanmoins à tester si la niche périphérique peut soutenir la PH des lymphocytes T CD4⁺ naïfs dans un contexte de GVHD. L'injection de FL dans des souris en GVHD reste toutefois matière à controverse (Blazar et al., 2001c; Teshima et al., 2002b). Plusieurs études se contredisent quant à son action bénéfique. Il se pourrait que l'augmentation du nombre de DC par le FL permette l'activation d'un plus grand nombre de lymphocytes T alloréactifs et ainsi accroisse la sévérité de la GVHD.

L'intérêt d'utiliser notre modèle de prolifération homéostatique devient pertinent dans un contexte de reconstitution immunitaire. Chez les patients en GVHD, le répertoire lymphocytaire est constitué de quelques clones qui ont proliféré massivement suite à la reconnaissance d'antigènes de l'hôte. Ce manque de diversité de répertoire rend les patients beaucoup plus susceptibles aux infections. À l'inverse, le transfert de lymphocytes T naïfs dans un hôte IL-7R $\alpha^{-/-}$ permet la prolifération des cellules et le maintien d'un répertoire varié (Osborne et al., 2011). Une adaptation de notre modèle *in vivo* ou *in vitro* pourrait être utile dans la reconstitution immunitaire des patients greffés.

Il est important de mentionner que les greffes haploidentiques (parent dans F₁ dans notre modèle) sont dotées d'une incompatibilité majeur du CMH et de ce fait ne reflète pas la réalité en clinique. Cependant, rien n'empêche de croire que le même phénomène puisse avoir lieu dans les greffes CMH-compatible, où l'élimination des DC se ferait suite à la présentation d'antigènes mineurs (Loyer et al., 1999). De plus, l'intérêt croissant envers les transplantations haploidentiques de cellules souches hématopoïétiques chez l'humain justifie l'étude de la reconstitution immunitaire dans ce contexte (bien que la déplétion des

lymphocytes T soit généralement nécessaire dans les transplantations haploidentiques afin d'éviter une GVHD létale). Il serait possible d'éliminer *in vitro* les lymphocytes T alloréactifs par photophérèse pour ainsi injecter au patient les lymphocytes T non-alloréactifs (mais protecteurs contre les pathogènes), et permettre leur expansion grâce à une niche régénérée et fonctionnelle.

Plusieurs études rapportent des cas de résistance hybride dans le modèle parent dans F₁ (B6→B6D2F₁). La résistance hybride est causée par les cellules NK du receveur qui ont survécu à l'irradiation et détruisent les cellules du donneur qui n'expriment pas le même CMH I (Kumar et al., 1997). Toutefois, l'absence de DC ne peut pas être causée par la résistance hybride puisque ces DC sont présentes dans les souris greffées sans GVHD. De plus, le transfert de lymphocytes T du parent (alloréactifs) avec la moelle osseuse dans les souris F₁ élimine cet effet (Knobloch et Dennert, 1988).

6.4 Impact clinique de l'absence des lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺, plus précisément les lymphocytes T CD4⁺ « helper » (Th) sont nécessaires à l'activation et la régulation de plusieurs étapes de la réponse immunitaire contre les infections ainsi qu'au bon fonctionnement des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Ceci explique pourquoi les patients atteints de GVHD sont vulnérables à de simples infections comme la grippe.

D'un point de vue général, les lymphocytes T CD8⁺ sont considérés comme les cellules nécessaires à l'élimination des pathogènes ou corps malins tandis que le rôle des Th est d'orchestrer la réponse immunitaire. C'est pourquoi la majorité des travaux en immunothérapie du cancer sont effectués avec des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques réactifs contre la tumeur. Le transfert d'une grande quantité de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques réactifs contre la tumeur développés *in vitro* entraîne une réponse anti-tumorale jusqu'à chez 72% des patients qui reçoivent des traitements parallèles de lymphodéplétion et d'irradiation (Dudley et al., 2008). Cependant, l'instabilité génétique peut entraîner l'arrêt de l'expression du CMH I sur les cellules tumorales, rendant les

lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques inefficaces. D'ailleurs, on note peu souvent une rémission complète. De plus, les lymphocytes T CD8⁺ n'ont pas la capacité d'élargir la réponse anti-tumorale et meurent généralement par exhaustion sans générer de lymphocytes T CD8⁺ mémoires contre les cellules tumorales. Plusieurs études démontrent la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à engendrer une réponse anti-tumorale (Muranski et Restifo, 2009). Perez-Diez et ses collègues, bien qu'utilisant un modèle de lymphocytes T TCR-transgénique, concluent dans leur article que les lymphocytes T CD4⁺ ont une meilleure capacité à éliminer les cellules tumorales que les lymphocytes T CD8⁺, et cela même quand les cellules tumorales n'expriment pas le CMH II (Perez-Diez et al., 2007). Ceci s'explique par le fait que, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également reconnaître les antigènes tumoraux grâce au CMH II exprimé par les APC. Les lymphocytes T CD4⁺ une fois activés permettent aux APC d'activer les lymphocytes T CD8⁺ et recrutent des macrophages et des cellules NK, ce qui amplifie la réponse anti-tumorale. D'ailleurs, dans un modèle de lymphocytes T CD8⁺ TCR transgénique spécifiques à un antigène tumoral, l'ajout de lymphocytes T CD4⁺ naïfs augmente la régression de la tumeur, démontrant ainsi leur potentiel dans le déclenchement d'une réponse anti-tumorale de plus grande amplitude (Antony et al., 2005).

Récemment, Quezada et ses collègues ont démontré que le transfert d'une faible quantité de lymphocytes T CD4⁺ naïfs réactifs contre la tumeur dans un hôte lymphopénique engendre une forte expansion du nombre de ces lymphocytes T CD4⁺, leur activation et finalement l'élimination de la tumeur (Quezada et al., 2010). Ces observations reflètent la possibilité d'une réaction anti-tumorale par les lymphocytes T CD4⁺ dans le contexte d'une lymphopénie causée par la GVHD suite à une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

6.5 Impact clinique de l'absence des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes et jouent un rôle clé dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. De plus, l'homéostasie des lymphocytes T ainsi que des cellules NK dépend de ces cellules (Takada et Jameson, 2009; Guimond et al., 2010). Il est donc naturel que l'absence des DC affecte la réponse immunitaire et augmente les risques d'infections suite à une greffe de moelle osseuse allogénique.

La réaction anti-tumorale observée suite à une greffe de moelle osseuse allogénique est une forme très efficace d'immunothérapie. Les lymphocytes T cytotoxiques ainsi que les cellules NK sont reconnus comme jouant un rôle clé dans la GVL. Un des points importants dans le déclenchement de la GVL est l'activation des lymphocytes T contre les antigènes mineurs d'histocompatibilité présentés soit sur la tumeur, soit partagés entre l'hôte et la tumeur. Pour cela, les lymphocytes T nécessitent la présentation des antigènes par les DC. Reddy et ses collègues démontrent que lors d'une greffe de moelle osseuse, les DC résiduelles de l'hôte ne suffisent pas à générer une GVL et que les DC du donneur nouvellement générées peuvent contribuer à déclencher une réponse anti-tumorale (Reddy et al., 2005). Cependant, les auteurs démontrent que les DC du donneur n'induisent une GVL efficace que lorsque la charge tumorale est réduite. Dans un contexte de transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques suite à un régime de préparation contre une leucémie, l'importance d'avoir des DC du donneur fonctionnelles devient très pertinente. Les patients ont alors une faible charge tumorale et les lymphocytes T allogéniques du donneur peuvent induire une GVL qui pourrait être plus intense si les DC du donneur étaient présentes.

Nous avons démontré que le nombre de DC est diminué au niveau de la rate des souris en GVHD. Nous pouvons à partir de ces résultats nous demander si les DC situées au niveau du thymus sont aussi affectées. Les DC thymiques jouent un rôle clé dans la sélection négative des lymphocytes T, et leur absence pourrait entraîner la production de lymphocytes T autoréactifs. Comparé à la GVHD aiguë, l'étiologie de la GVHD chronique est moins bien connue (Ferrara et al., 2009). Les cliniciens et les chercheurs s'entendent

toutefois sur le fait que la GVHD chronique ressemble d'avantage à une maladie auto-immune chronique qu'à une réaction cytotoxique comme la GVHD aiguë. Le passage d'une réaction immunitaire à une réaction auto-immune semble indiquer une génération de cellules autoréactives. Edelman et ses collègues démontrent que des lymphocytes T CD8⁺ naïfs OT-I Ly5.1⁺ exogènes qui ont été injectés dans une souris DC-STAMP-OVA (le peptide OVA se retrouvant exprimé seulement à la surface des DC) greffée avec de la moelle osseuse de souris OT-I Thy1.1⁺ peuvent s'activer et migrer dans le thymus où ils induisent un arrêt de la sélection négative et la génération des lymphocytes T autoréactifs endogènes Th1.1⁺ (Edelman et al., 2011). Bien qu'ils ne le démontrent pas directement, les auteurs concluent que les lymphocytes T qui ont migré dans le thymus éliminent les DC thymiques et les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC).

De manière plus adaptée à la situation clinique en réalisant des greffes CMH-compatible, Zhang et ses collègues démontrent que des lymphocytes T CD4⁺ générés à partir de la moelle osseuse du donneur peuvent induire une GVHD chronique (Zhang et al., 2007). Ces lymphocytes T CD4⁺ se développent dans un thymus endommagé par la GVHD aiguë causée par les lymphocytes T CD8⁺. D'autre part, l'injection de keratinocyte growth factor (KGF), connu pour augmenter le nombre de DC thymiques, empêche la génération des ces lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs.

Conclusion

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques a, en quelques décennies, évolué d'une technique expérimentale au traitement standard contre différents types de cancers, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Malgré de nombreux progrès dans le domaine (régime de préparation, détermination des antigènes majeurs d'histocompatibilité, prophylaxie, etc.), les succès de cette technique sont restreints par la maladie du greffon contre l'hôte, les rechutes et les infections opportunistes. De façon significative, la réaction anti-tumorale qui permet d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles, ainsi que la réaction immunitaire qui permet de défendre l'organisme des infections, dépendent de la reconstitution du système hématopoïétique post-transplantation. Malheureusement, la maladie du greffon contre l'hôte entrave la reconstitution du système hématopoïétique en entraînant des dommages et une immunosuppression grave. Indubitablement, la reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ est fortement affectée par cette immunosuppression.

Nous avons émis l'hypothèse que l'absence de reconstitution des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients en GVHD était due à un défaut fonctionnel des cellules dendritiques. Toutefois, nos résultats chez la souris ont permis de découvrir que l'absence de cellules dendritiques, et non un défaut fonctionnel, était responsable du déficit de lymphocytes T CD4⁺ observé dans un hôte en GVHD. Cette absence de cellules dendritiques semble être en partie causée par leur élimination par les lymphocytes T alloréactifs. En effet, même si les lymphocytes T et les DC générées dans l'hôte proviennent du même donneur, la capacité des DC à présenter des antigènes de l'hôte entraîne leur reconnaissance par les lymphocytes T alloréactifs et leur élimination comme les cellules de l'hôte. La GVHD entraîne aussi des dommages au niveau de la moelle osseuse. L'absence des DC pourrait également être due à l'élimination des cellules progénitrices, ou l'inhibition de leur maturation, par la présence ou l'absence de cytokines.

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques permet de guérir un bon nombre de patients atteints de leucémie et de lymphome. Malheureusement, la reconstitution défaillante du système immunitaire demeure toujours un problème. En effet, l'absence de lymphocytes T CD4⁺ restreint la réponse immunitaire et la réponse anti-tumorale, rendant ainsi les patients plus susceptibles aux infections ou aux rechutes leucémiques. Qui plus est, l'absence des DC est directement liée à la perte de reconstitution des lymphocytes T CD4⁺.

De plus, les DC sont elle-même impliquées dans la réponse immunitaire et la réponse anti-tumorale. Des stratégies permettant la régénération de ces deux types cellulaires permettraient d'améliorer les conditions de vie des patients greffés et d'améliorer les succès de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Références

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

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

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

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

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

Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., Palmer, D. C., Chan, C.-C., Klebanoff, C. A., Overwijk, W. W., et al. (2005). CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J. Immunol* *174*, 2591-2601.

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

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

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

Banwell, C. M., Partington, K. M., Jenkinson, E. J., et Anderson, G. (2000). Studies on the role of IL-7 presentation by mesenchymal fibroblasts during early thymocyte development. *Eur. J. Immunol* 30, 2125-2129.

BARNES, D. W. H., et LOUTIT, J. F. (1953). Protective effects of implants of splenic tissue. *Proc. R. Soc. Med* 46, 251-252.

BARNES, D. W., CORP, M. J., LOUTIT, J. F., et NEAL, F. E. (1956). Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2, 626-627.

Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., et Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med* 195, 1541-1548.

van Bekkum, D. W., de Vries, M. J., et van der Waay, D. (1967). Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J. Natl. Cancer Inst* 38, 223-231.

Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., et Tough, D. F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8⁺ T cells. *J. Immunol* 170, 5018-5026.

Beutler, E., Blume, K. G., Bross, K. J., Chillar, R. K., Ellington, O. B., Fahey, J. L., Farbstein, M. J., Schmidt, G. M., Spruce, W. E., et Turner, M. A. (1979). Bone marrow transplantation as the treatment of choice for « good risk » adult patients with acute leukemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 92, 189-195.

Billingham, R. E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62, 21-78.

BILLINGHAM, R. E., et BRENT, L. (1957). Acquired tolerance in newborn mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 69, 678-680.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579-1586.

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

Blazar, B. R., Kwon, B. S., Panoskaltsis-Mortari, A., Kwak, K. B., Peschon, J. J., et Taylor, P. A. (2001a). Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J. Immunol* *166*, 3174-3183.

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

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

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

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

Bolwell, B., Sobecks, R., Pohlman, B., Andresen, S., Rybicki, L., Kuczkowski, E., et Kalaycio, M. (2004). A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* *34*, 621-625.

Boyman, O., Ramsey, C., Kim, D. M., Sprent, J., et Surh, C. D. (2008). IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *J. Immunol* *180*, 7265-7275.

Brochu, S., Rioux-Massé, B., Roy, J., Roy, D. C., et Perreault, C. (1999). Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host disease. *Blood* *94*, 390-400.

Buckner, C. D., Epstein, R. B., Rudolph, R. H., Clift, R. A., Storb, R., et Thomas, E. D. (2001). Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. 1970. *J. Hematother. Stem Cell Res* *10*, 201-208.

Buhlmann, J. E., Gonzalez, M., Ginther, B., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B. R., Greiner, D. L., Rossini, A. A., Flavell, R., et Noelle, R. J. (1999). Cutting edge: sustained expansion of CD8⁺ T cells requires CD154 expression by Th cells in acute graft versus host disease. *J. Immunol* *162*, 4373-4376.

Cahn, J.-Y., Klein, J. P., Lee, S. J., Milpied, N., Blaise, D., Antin, J. H., Leblond, V., Ifrah, N., Jouet, J.-P., Loberiza, F., et al. (2005). Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* *106*, 1495-1500.

CAVINS, J. A., KASAKURA, S., THOMAS, E. D., et FERREBEE, J. W. (1962). Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethylsulphoxide. *Blood* *20*, 730-734.

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

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

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

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

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

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

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

Cooke, K. R., Gerbitz, A., Crawford, J. M., Teshima, T., Hill, G. R., Tesolin, A., Rossignol, D. P., et Ferrara, J. L. (2001). LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest* 107, 1581-1589.

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

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

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

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

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

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

Dulude, G., Roy, D. C., et Perreault, C. (1999). The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J. Exp. Med* *189*, 1329-1342.

Edelmann, S. L., Marconi, P., et Brocker, T. (2011). Peripheral T cells re-enter the thymus and interfere with central tolerance induction. *J. Immunol* *186*, 5612-5619.

Epstein, R. B., Storb, R., Clift, R. A., et Thomas, E. D. (1969). Transplantation of stored allogeneic bone marrow in dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* *8*, 496-501.

Epstein, R. B., Storb, R., Ragde, H., et Thomas, E. D. (1968). Cytotoxic typing antisera for marrow grafting in littermate dogs. *Transplantation* *6*, 45-58.

Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J., et Surh, C. D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* *11*, 173-181.

Facchetti, F., Vermi, W., Mason, D., et Colonna, M. (2003). The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Archiv* *443*, 703-717.

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

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

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

Fry, T. J., et Mackall, C. L. (2001). Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol* *22*, 564-571.

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

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

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

GOOD, R. A., DALMASSO, A. P., MARTINEZ, C., ARCHER, O. K., PIERCE, J. C., et PAPERMASTER, B. W. (1962). The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. *J. Exp. Med* *116*, 773-796.

Gorski, J., Chen, X., Gendelman, M., Yassai, M., Krueger, A., Tivol, E., Logan, B., Komorowski, R., Vodanovic-Jankovic, S., et Drobyski, W. R. (2007). Homeostatic expansion and repertoire regeneration of donor T cells during graft versus host disease is constrained by the host environment. *Blood* *109*, 5502-5510.

Greinix, H. T., Knobler, R. M., Worel, N., Schneider, B., Schneeberger, A., Hoecker, P., Mitterbauer, M., Rabitsch, W., Schulenburg, A., et Kalhs, P. (2006). The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* *91*, 405-408.

Grossman, Z., et Paul, W. E. (2001). Autoreactivity, dynamic tuning and selectivity. *Curr. Opin. Immunol* *13*, 687-698.

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

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

Guimond, M., Freud, A. G., Mao, H. C., Yu, J., Blaser, B. W., Leong, J. W., Vandeusen, J. B., Dorrance, A., Zhang, J., Mackall, C. L., et al. (2010). In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J. Immunol* *184*, 2769-2775.

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

Hakim, F. T., Cepeda, R., Gray, G. S., June, C. H., et Abe, R. (1995). Acute graft-versus-host reaction can be aborted by blockade of costimulatory molecules. *J. Immunol* *155*, 1757-1766.

- Hamilton, S. E., Wolkers, M. C., Schoenberger, S. P., et Jameson, S. C. (2006). The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nat. Immunol* 7, 475-481.
- Hao, Y., Legrand, N., et Freitas, A. A. (2006). The clone size of peripheral CD8 T cells is regulated by TCR promiscuity. *J. Exp. Med* 203, 1643-1649.
- Hashimoto, D., Asakura, S., Matsuoka, K.-ichi, Sakoda, Y., Koyama, M., Aoyama, K., Tanimoto, M., et Teshima, T. (2007). FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *Eur. J. Immunol* 37, 271-281.
- Hataye, J., Moon, J. J., Khoruts, A., Reilly, C., et Jenkins, M. K. (2006). Naive and memory CD4⁺ T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 312, 114-116.
- Hermans, I. F., Ritchie, D. S., Yang, J., Roberts, J. M., et Ronchese, F. (2000). CD8⁺ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J. Immunol* 164, 3095-3101.
- Hervé, P., Cahn, J. Y., Flesch, M., Plouvier, E., Racadot, E., Noir, A., Couteret, Y., Goldstein, G., Bernard, A., et Lenys, R. (1987). Successful graft-versus-host disease prevention without graft failure in 32 HLA-identical allogeneic bone marrow transplantations with marrow depleted of T cells by monoclonal antibodies and complement. *Blood* 69, 388-393.
- Hill, G. R., Crawford, J. M., Cooke, K. R., Brinson, Y. S., Pan, L., et Ferrara, J. L. (1997). Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90, 3204-3213.
- Hill, G. R., et Ferrara, J. L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-2759.
- Horowitz, M., Gale, R., Sondel, P., Goldman, J., Kersey, J., Kolb, H., Rimm, A., Ringden, O., Rozman, C., et Speck, B. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75, 555 -562.

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

Huang, T., Wei, B., Velazquez, P., Borneman, J., et Braun, J. (2005). Commensal microbiota alter the abundance and TCR responsiveness of splenic naïve CD4⁺ T lymphocytes. *Clin. Immunol* 117, 221-230.

Intlekofer, A. M., Takemoto, N., Wherry, E. J., Longworth, S. A., Northrup, J. T., Palanivel, V. R., Mullen, A. C., Gasink, C. R., Kaech, S. M., Miller, J. D., et al. (2005). Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol* 6, 1236-1244.

JACOBSON, L. O., et MARKS, E. K. (1949). The role of the spleen in radiation injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 70, 740-742.

Jameson, S. C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2, 547-556.

Jensen, P. E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol* 8, 1041-1048.

Jiang, Q., Li, W. Q., Aiello, F. B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. R., et Durum, S. K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 513-533.

Judge, A. D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C. D., et Sprent, J. (2002). Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J. Exp. Med* 196, 935-946.

Kassiotis, G., Zamoyska, R., et Stockinger, B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med* 197, 1007-1016.

- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., et al. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J. Exp. Med* *191*, 771-780.
- Kernan, N. A., Collins, N. H., Juliano, L., Cartagena, T., Dupont, B., et O'Reilly, R. J. (1986). Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* *68*, 770-773.
- Kieper, W. C., Burghardt, J. T., et Surh, C. D. (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J. Immunol* *172*, 40-44.
- Kieper, W. C., Troy, A., Burghardt, J. T., Ramsey, C., Lee, J. Y., Jiang, H.-Q., Dummer, W., Shen, H., Cebra, J. J., et Surh, C. D. (2005). Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol* *174*, 3158-3163.
- King, C., Ilic, A., Koelsch, K., et Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* *117*, 265-277.
- Klyuchnikov, E., Asenova, S., Kern, W., Kilinc, G., Ayuk, F., Wiedemann, B., Lioznov, M., Freiberger, P., Zalyalov, Y., Zander, A. R., et al. (2010). Post-transplant immune reconstitution after unrelated allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* *51*, 1450-1463.
- Knobloch, C., et Dennert, G. (1988). Loss of F1 hybrid resistance to bone marrow grafts after injection of parental lymphocytes. Demonstration of parental anti-F1 T killer cells and general immunosuppression in the host. *Transplantation* *45*, 175-183.
- Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., et al. (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* *86*, 2041-2050.
- Korngold, R., et Sprent, J. (1983). Lethal GVHD across minor histocompatibility barriers: nature of the effector cells and role of the H-2 complex. *Immunol. Rev* *71*, 5-29.

- Krenger, W., Blazar, B. R., et Holländer, G. A. (2011). Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *117*, 6768 -6776.
- Krupica, T., Jr, Fry, T. J., et Mackall, C. L. (2006). Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin. Immunol* *120*, 121-128.
- Kumar, V., George, T., Yu, Y. Y., Liu, J., et Bennett, M. (1997). Role of murine NK cells and their receptors in hybrid resistance. *Curr. Opin. Immunol* *9*, 52-56.
- Labrecque, N., Whitfield, L. S., Obst, R., Waltzinger, C., Benoist, C., et Mathis, D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity* *15*, 71-82.
- Lee, R. S., Kuhr, C. S., Sale, G. E., Zellmer, E., Hogan, W. J., Storb, R., et Little, M.-T. (2003). FTY720 does not abrogate acute graft-versus-host disease in the dog leukocyte antigen-nonidentical unrelated canine model. *Transplantation* *76*, 1155-1158.
- Leitão, C., Freitas, A. A., et Garcia, S. (2009). The role of TCR specificity and clonal competition during reconstruction of the peripheral T cell pool. *J. Immunol* *182*, 5232-5239.
- Lenz, D. C., Kurz, S. K., Lemmens, E., Schoenberger, S. P., Sprent, J., Oldstone, M. B. A., et Homann, D. (2004). IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *101*, 9357-9362.
- Levine, J. E., Paczesny, S., Mineishi, S., Braun, T., Choi, S. W., Hutchinson, R. J., Jones, D., Khaled, Y., Kitko, C. L., Bickley, D., et al. (2008). Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* *111*, 2470-2475.
- Levine, J. E., Uberti, J. P., Ayash, L., Reynolds, C., Ferrara, J. L. m, Silver, S. M., Braun, T., Yanik, G., Hutchinson, R., et Ratanatharathorn, V. (2003). Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol. Blood Marrow Transplant* *9*, 189-197.
- Li, J., Semple, K., Suh, W.-K., Liu, C., Chen, F., Blazar, B. R., et Yu, X.-Z. (2011). Roles of CD28, CTLA4, and Inducible Costimulator in Acute Graft-versus-Host Disease in Mice. *Biol. Blood Marrow Transplant* *17*, 962-969.

LOCHTE, H. L., Jr, LEVY, A. S., GUENTHER, D. M., THOMAS, E. D., et FERREBEE, J. W. (1962). Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature* *196*, 1110-1111.

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

LORENZ, E., UPHOFF, D., REID, T. R., et SHELTON, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst* *12*, 197-201.

Loyer, V., Fontaine, P., Pion, S., Héту, F., Roy, D. C., et Perreault, C. (1999). The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol* *163*, 6462-6467.

Lynch, H. E., Goldberg, G. L., Chidgey, A., Van den Brink, M. R. M., Boyd, R., et Sempowski, G. D. (2009). Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* *30*, 366-373.

Mackall, C. L., Bare, C. V., Granger, L. A., Sharrow, S. O., Titus, J. A., et Gress, R. E. (1996). Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J. Immunol* *156*, 4609-4616.

Mackall, C. L., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Andrich, M. P., Chen, C. C., Feuerstein, I. M., Horowitz, M. E., Magrath, I. T., Shad, A. T., et Steinberg, S. M. (1995). Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N. Engl. J. Med* *332*, 143-149.

MacMillan, M. L., Weisdorf, D. J., Wagner, J. E., DeFor, T. E., Burns, L. J., Ramsay, N. K. C., Davies, S. M., et Blazar, B. R. (2002). Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *8*, 387-394.

- MAIN, J. M., et PREHN, R. T. (1955). Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst* *15*, 1023-1029.
- MANNICK, J. A., LOCHTE, H. L., Jr, ASHLEY, C. A., THOMAS, E. D., et FERREBEE, J. W. (1960). Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* *15*, 255-266.
- Marks, L., Altman, N. H., Podack, E. R., et Levy, R. B. (2004). Donor T cells lacking Fas ligand and perforin retain the capacity to induce severe GvHD in minor histocompatibility antigen mismatched bone-marrow transplantation recipients. *Transplantation* *77*, 804-812.
- Martin, P. J., Schoch, G., Fisher, L., Byers, V., Anasetti, C., Appelbaum, F. R., Beatty, P. G., Doney, K., McDonald, G. B., et Sanders, J. E. (1990). A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* *76*, 1464-1472.
- Matte, C. C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B. E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J., et Shlomchik, W. D. (2004). Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* *10*, 987-992.
- Medema, J. P., Schuurhuis, D. H., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S. A., Laban, S., Toes, R. E., Toebes, M., Schumacher, T. N., et al. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J. Exp. Med* *194*, 657-667.
- Melchionda, F., Fry, T. J., Milliron, M. J., McKirdy, M. A., Tagaya, Y., et Mackall, C. L. (2005). Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J. Clin. Invest* *115*, 1177-1187.
- Mertsching, E., Burdet, C., et Ceredig, R. (1995). IL-7 transgenic mice: analysis of the role of IL-7 in the differentiation of thymocytes in vivo and in vitro. *Int. Immunol* *7*, 401-414.
- Mestas, J., et Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol* *172*, 2731-2738.

Miller, J. F. A. P. (2011). The golden anniversary of the thymus. *Nat Rev Immunol* *11*, 489-495.

MILLER, J. F., et MOREMAN, K. G. (1963). THE ROLE OF THE THYMUS IN IMMUNITY. *Med Biol Illus* *13*, 146-151.

Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J., et Paul, W. E. (2005). Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol* *174*, 6039-6044.

Min, D., Taylor, P. A., Panoskaltsis-Mortari, A., Chung, B., Danilenko, D. M., Farrell, C., Lacey, D. L., Blazar, B. R., et Weinberg, K. I. (2002). Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* *99*, 4592-4600.

Modiano, J. F., Johnson, L. D. S., et Bellgrau, D. (2008). Negative regulators in homeostasis of naïve peripheral T cells. *Immunol. Res* *41*, 137-153.

Moon, J. J., Chu, H. H., Pepper, M., McSorley, S. J., Jameson, S. C., Kedl, R. M., et Jenkins, M. K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* *27*, 203-213.

Moses, C. T., Thorstenson, K. M., Jameson, S. C., et Khoruts, A. (2003). Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *100*, 1185-1190.

Mueller, S. N., Jones, C. M., Stock, A. T., Suter, M., Heath, W. R., et Carbone, F. R. (2006). CD4+ T cells can protect APC from CTL-mediated elimination. *J. Immunol* *176*, 7379-7384.

Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., et Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* *286*, 1377-1381.

Muranski, P., et Restifo, N. P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. *Current Opinion in Immunology* *21*, 200-208.

Negrin, R. S., et Contag, C. H. (2006). In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol* 6, 484-490.

Nozawa, K., Ohata, J., Sakurai, J., Hashimoto, H., Miyajima, H., Yagita, H., Okumura, K., et Azuma, M. (2001). Preferential blockade of CD8(+) T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute and chronic graft-versus-host diseases. *J. Immunol* 167, 4981-4986.

Ordemann, R., Hutchinson, R., Friedman, J., Burakoff, S. J., Reddy, P., Duffner, U., Braun, T. M., Liu, C., Teshima, T., et Ferrara, J. L. M. (2002). Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest* 109, 1249-1256.

Osborne, L. C., Patton, D. T., Seo, J. H., et Abraham, N. (2011). Elevated IL-7 availability does not account for T cell proliferation in moderate lymphopenia. *J. Immunol* 186, 1981-1988.

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

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

Paul, W. E. (2008). *Fundamental Immunology*, 6th edition. Available at: <http://solution.lww.com/fundamentalimmunology> [Consulté août 4, 2011].

Perez-Diez, A., Joncker, N. T., Choi, K., Chan, W. F. N., Anderson, C. C., Lantz, O., et Matzinger, P. (2007). CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* 109, 5346 -5354.

- Pérez-Simón, J. A., Díez-Campelo, M., Martino, R., Brunet, S., Urbano, A., Caballero, M. D., de León, A., Valcárcel, D., Carreras, E., del Cañizo, M. C., et al. (2005). Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *Br. J. Haematol* *130*, 394-403.
- Porta, M. D., Rigolin, G. M., Alessandrino, E. P., Maiocchi, M., Malcovati, L., Vanelli, L., Baratè, C., Rumi, E., Ciccone, M., Cuneo, A., et al. (2004). Dendritic cell recovery after allogeneic stem-cell transplantation in acute leukemia: correlations with clinical and transplant characteristics. *European Journal of Haematology* *72*, 18-25.
- Purton, J. F., Tan, J. T., Rubinstein, M. P., Kim, D. M., Sprent, J., et Surh, C. D. (2007). Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent. *J. Exp. Med* *204*, 951-961.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., et al. (2010). Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine* *207*, 637 -650.
- Ramsey, C., Rubinstein, M. P., Kim, D. M., Cho, J.-H., Sprent, J., et Surh, C. D. (2008). The lymphopenic environment of CD132 (common gamma-chain)-deficient hosts elicits rapid homeostatic proliferation of naive T cells via IL-15. *J. Immunol* *180*, 5320-5326.
- Rathmell, J. C., Farkash, E. A., Gao, W., et Thompson, C. B. (2001). IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells. *J. Immunol* *167*, 6869-6876.
- Reddy, P., Maeda, Y., Liu, C., Krijanovski, O. I., Korngold, R., et Ferrara, J. L. M. (2005). A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat. Med* *11*, 1244-1249.
- Reddy, V., Iturraspe, J. A., Tzolas, A. C., Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J., et Wingard, J. R. (2004). Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood* *103*, 4330-4335.
- VAN ROOD, J. J., EERNISSE, J. G., et VAN LEEUWEN, A. (1958). Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* *181*, 1735-1736.

- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., et Lefrançois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol* *1*, 426-432.
- Schroeder, M. A., et DiPersio, J. F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech* *4*, 318-333.
- Seddon, B., et Zamoyska, R. (2002). TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naïve T cells. *J. Immunol* *169*, 2997-3005.
- Shaw, B. E., Arguello, R., Garcia-Sepulveda, C. A., et Madrigal, J. A. (2010). The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* *150*, 251-258.
- Shlomchik, W. D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* *7*, 340-352.
- Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J., et Emerson, S. G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* *285*, 412-415.
- Shono, Y., Ueha, S., Wang, Y., Abe, J., Kurachi, M., Matsuno, Y., Sugiyama, T., Nagasawa, T., Imamura, M., et Matsushima, K. (2010). Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *115*, 5401 -5411.
- Sinclair, L. V., Finlay, D., Feijoo, C., Cornish, G. H., Gray, A., Ager, A., Okkenhaug, K., Hagenbeek, T. J., Spits, H., et Cantrell, D. A. (2008). Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol* *9*, 513-521.
- Sinha, M. L., Fry, T. J., Fowler, D. H., Miller, G., et Mackall, C. L. (2002). Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* *100*, 2642 -2649.
- Socié, G., et Blazar, B. R. (2009). Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood* *114*, 4327 -4336.

- Song, J., Ito, T., Matsuda, C., Miao, G., Tanemura, M., Nishida, T., Nozawa, M., Matsuda, H., et Sawa, Y. (2006). Inhibition of donor-derived T cells trafficking into target organs by FTY720 during acute graft-versus-host disease in small bowel transplantation. *Clin. Exp. Immunol* *146*, 85-92.
- Sprent, J., et Tough, D. F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* *265*, 1395-1400.
- Sprent, J., Schaefer, M., Lo, D., et Korngold, R. (1986). Properties of purified T cell subsets. II. In vivo responses to class I vs. class II H-2 differences. *J. Exp. Med* *163*, 998-1011.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., et Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol* *21*, 139-176.
- Storb, R., Epstein, R. B., Rudolph, R. H., et Thomas, E. D. (1969). Allogeneic canine bone marrow transplantation following cyclophosphamide. *Transplantation* *7*, 378-386.
- Storek, J. (2008). Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation – its relation to the contents of the graft. *Expert Opin. Biol. Ther.* *8*, 583-597.
- Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J., et Roosnek, E. (2008). Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* *30*, 425-437.
- Surh, C. D., et Sprent, J. (2008). Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* *29*, 848-862.
- Suzuki, H., Kündig, T. M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J. J., Ohashi, P. S., et Griesser, H. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* *268*, 1472-1476.
- Swain, S. L., Hu, H., et Huston, G. (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* *286*, 1381-1383.

- Takada, K., et Jameson, S. C. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nat Rev Immunol* 9, 823-832.
- Takeda, S., Rodewald, H. R., Arakawa, H., Bluethmann, H., et Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, 217-228.
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., et Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 8732-8737.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A., et Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
- Tanel, A., Fonseca, S. G., Yassine-Diab, B., Bordi, R., Zeidan, J., Shi, Y., Benne, C., et Sékaly, R.-P. (2009). Cellular and molecular mechanisms of memory T-cell survival. *Expert Rev Vaccines* 8, 299-312.
- Taylor, P. A., Panoskaltis-Mortari, A., Freeman, G. J., Sharpe, A. H., Noelle, R. J., Rudensky, A. Y., Mak, T. W., Serody, J. S., et Blazar, B. R. (2005). Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM). *Blood* 105, 3372-3380.
- Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K. R., et Ferrara, J. L. M. (2002a). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med* 8, 575-581.
- Teshima, T., Reddy, P., Lowler, K. P., KuKuruga, M. A., Liu, C., Cooke, K. R., et Ferrara, J. L. M. (2002b). Flt3 ligand therapy for recipients of allogeneic bone marrow transplants expands host CD8 α ⁺ dendritic cells and reduces experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 99, 1825 -1832.

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

Thomas, E. D. (1999). A history of haemopoietic cell transplantation. *British Journal of Haematology* 105, 330-339.

Thomas, E. D., Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Sale, G. E., Sanders, J. E., Singer, J. W., Shulman, H., et al. (1979). Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med* 301, 597-599.

THOMAS, E. D., LOCHTE, H. L., Jr, CANNON, J. H., SAHLER, O. D., et FERREBEE, J. W. (1959). Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest* 38, 1709-1716.

THOMAS, E. D., LOCHTE, H. L., Jr, LU, W. C., et FERREBEE, J. W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med* 257, 491-496.

Troy, A. E., et Shen, H. (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J. Immunol* 170, 672-676.

Truitt, R. L., et Atasoylu, A. A. (1991). Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 8, 51-58.

Tsukada, N., Akiba, H., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H., et Okumura, K. (2000). Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2434-2439.

UPHOFF, D. E. (1958). Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 99, 651-653.

- Uzunel, M., Remberger, M., Sairafi, D., Hassan, Z., Mattsson, J., Omazic, B., Barkholt, L., et Ringdén, O. (2006). Unrelated versus related allogeneic stem cell transplantation after reduced intensity conditioning. *Transplantation* 82, 913-919.
- Vakkila, J., Thomson, A. W., Hovi, L., Vettenranta, K., et Saarinen-Pihkala, U. M. (2005). Circulating dendritic cell subset levels after allogeneic stem cell transplantation in children correlate with time post transplant and severity of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 35, 501-507.
- Vella, A., Teague, T. K., Ihle, J., Kappler, J., et Marrack, P. (1997). Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J. Exp. Med* 186, 325-330.
- Viret, C., Wong, F. S., et Janeway, C. A., Jr (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10, 559-568.
- Vivien, L., Benoist, C., et Mathis, D. (2001). T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int. Immunol* 13, 763-768.
- Vos, Q., Jones, L. A., et Kruisbeek, A. M. (1992). Mice deprived of exogenous antigenic stimulation develop a normal repertoire of functional T cells. *J. Immunol* 149, 1204-1210.
- Vremec, D., et Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *The Journal of Immunology* 159, 565 -573.
- Wakim, L. M., et Bevan, M. J. (2011). Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* 471, 629-632.
- Wang, C., Lin, G. H. Y., McPherson, A. J., et Watts, T. H. (2009). Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunol. Rev* 229, 192-215.
- Watchmaker, P. B., Urban, J. A., Berk, E., Nakamura, Y., Mailliard, R. B., Watkins, S. C., van Ham, S. M., et Kalinski, P. (2008). Memory CD8+ T cells protect dendritic cells from CTL killing. *J. Immunol* 180, 3857-3865.

- Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., et Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med* *300*, 1068-1073.
- Willerford, D. M., Chen, J., Ferry, J. A., Davidson, L., Ma, A., et Alt, F. W. (1995). Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* *3*, 521-530.
- Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., et Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood* *111*, 2101-2111.
- Wong, P., Barton, G. M., Forbush, K. A., et Rudensky, A. Y. (2001). Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J. Exp. Med* *193*, 1179-1187.
- Xun, C. Q., Thompson, J. S., Jennings, C. D., Brown, S. A., et Widmer, M. B. (1994). Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* *83*, 2360-2367.
- Yang, J., Huck, S. P., McHugh, R. S., Hermans, I. F., et Ronchese, F. (2006). Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 147-152.
- Yao, Z., Cui, Y., Watford, W. T., Bream, J. H., Yamaoka, K., Hissong, B. D., Li, D., Durum, S. K., Jiang, Q., Bhandoola, A., et al. (2006). Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 1000-1005.
- Yu, X. Z., Bidwell, S. J., Martin, P. J., et Anasetti, C. (2000). CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol* *164*, 4564-4568.
- Yu, X.-Z., Albert, M. H., et Anasetti, C. (2006). Alloantigen affinity and CD4 help determine severity of graft-versus-host disease mediated by CD8 donor T cells. *J. Immunol* *176*, 3383-3390.

Zhang, C., Todorov, I., Zhang, Z., Liu, Y., Kandeel, F., Forman, S., Strober, S., et Zeng, D. (2006). Donor CD4⁺ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* *107*, 2993-3001.

Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., et Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* *8*, 591-599.

Zhang, Y., Hexner, E., Frank, D., et Emerson, S. G. (2007). CD4⁺ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol* *179*, 3305-3314.

